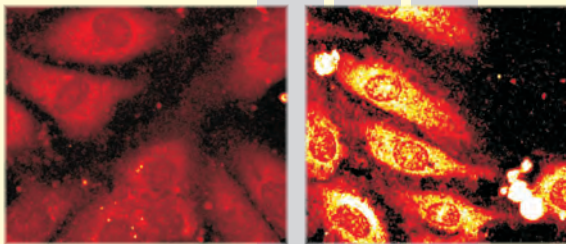


TRANSIENTE HYPOXIE SCHÜTZT ENDOTHELZELLEN VOR APOPTOSE ÜBER MEK/ERK-VERMITTELTE BAD-PHOSPHORYLIERUNG

MARION HOLL

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. J. Roth

und

dem Institut für Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. T. Noll

Transiente Hypoxie schützt Endothelzellen vor Apoptose über MEK/ERK-vermittelte Bad-Phosphorylierung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr.med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Marion Holl

Tierärztin aus Stuttgart

Gießen 2008

Angefertigt im Rahmen des Graduiertenkollegs 534

Gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof Dr. J. Roth

PD Dr. T. Noll

Tag der Disputation: 02. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	5
1 Einleitung	9
2 Literaturübersicht	10
2.1 Aufgaben und Bedeutung des Endothels.....	10
2.2 Hypoxie im Endothel	10
2.3 Apoptose	13
2.3.1 Definition und Bedeutung.....	13
2.3.2 Signalwege der Apoptose	14
2.3.3 Caspasen.....	16
2.4 Beeinflussung der apoptotischen Signalwege.....	17
2.4.1 Bcl-2-Familie	17
2.4.2 MAPK.....	19
2.4.3 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg	21
2.5 Zielsetzung der Arbeit	22
3 Material	23
3.1 Chemikalien.....	23
3.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien	23
3.1.2 Agonisten und Inhibitoren	24
3.1.3 Antisense- und Sense-Oligonukleotide	25
3.1.4 Molekulargewichtsmarker	25
3.1.5 Antikörper	25
3.1.6 Verwendete Kits.....	26
3.2 Geräte und Laborbedarf	27
3.2.1 Zellkultur	27
3.2.2 Gelelektrophorese.....	27
3.2.3 Sonstige Geräte	27
3.2.4 Verbrauchsmaterialien	28
3.2.5 Auswertung	29

4	Methoden	30
4.1	Gewinnung von Endothelzellen	30
4.1.1	Isolierung von Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene	30
4.1.2	Isolierung von Endothelzellen aus dem Rattenherzen	31
4.1.3	Isolierung von Endothelzellen aus der Schweineaorta	32
4.2	Zellkultur	33
4.2.1	Lösungen in der Zellkultur	33
4.2.2	Ausplattieren und Kultivieren der Primärkulturen	36
4.3	Behandlung der Zellen	36
4.3.1	Anlegen der Versuchsschalen	36
4.3.2	Zellkulturmodell	37
4.3.3	Einsatz des Hemmstoffes PD 98059	38
4.3.4	Transfektion der Endothelzellen mit Oligonukleotiden	38
4.4	Trypsinisierung und Zellzählung	38
4.5	Durchflusszytometrie	39
4.5.1	Apoptosenachweis (AnnexinV-Propidiumiodid-Assay)	39
4.5.2	Zellproliferationsnachweis (BrdU-Inkorporations-Assay)	41
4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
4.6.1	Probenvorbereitung	43
4.6.2	Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
4.6.3	Western-Blot	46
4.6.4	Reversible Proteinfärbung mit Ponceau S	47
4.6.5	Immunologischer Nachweis	48
4.7	Immuncytochemische Nachweisverfahren	49
4.7.1	Gewinnung der Präparate	49
4.7.2	Antikörperinkubation	49
4.7.3	Mikroskopie	50
4.8	Nachweis der DNA-Fragmentierung	50
4.8.1	Probenvorbereitung	50
4.8.2	Präparation der genomischen DNA	51
4.8.3	Bestimmung des DNA-Gehalts	52
4.8.4	Gelelektrophoretischer Nachweis der DNA-Fragmentierung	52
4.9	Statistik	53

5.	Ergebnisse	54
5.1	Wirkung transienter Hypoxie	54
5.1.1	Wirkung transienter Hypoxie auf die Zellzahl	54
5.1.2	Wirkung transienter Hypoxie auf die Bromdesoxyuridin-Inkorporation.....	57
5.1.3	Wirkung von Serumentzug auf die DNA-Fragmentierung	59
5.1.4	Wirkung von Hypoxie auf die Apoptoserate	60
5.2	Die Rolle der ERK2	63
5.2.1	Wirkung von Hypoxie auf die Phosphorylierung der ERK2	63
5.2.2	Rolle der ERK für den Hypoxie-Effekt.....	67
5.2.2.1	Rolle der ERK für den hypoxischen Zellzahl-Effekt.....	67
5.2.2.2	Einfluss von ERK2 auf die Apoptose	69
5.3	Die Rolle des Bcl-2 Familienmitglieds Bad.....	71
5.3.1	Rolle des MEK/ERK-Signalweges für die Bad-Phosphorylierung	71
5.3.2	Die Rolle des PI3-Kinase/Akt-Signalweges für die Bad-Phosphorylierung ...	75
5.4	Wirkung von Hypoxie auf die Caspase 3-Spaltung.....	76
5.4.1	Immuncytochemische Analyse.....	76
5.4.2	Gelelektrophoretische Analyse	77
6	Diskussion.....	81
6.1	Zellkulturmodell	81
6.2	Transiente Hypoxie schützt Endothelzellen vor dem apoptotischen Zelluntergang	82
6.3	Hypoxie führt zu einer transienten ERK2-Aktivierung.....	84
6.4	Hypoxie führt zu einer MEK/ERK-vermittelten Bad-Phosphorylierung..	85
6.5	Hypoxie führt über den MEK/MAPK-Bad-Signalweg zu verminderter Caspase 3-Spaltung.....	87
6.6	Schlussfolgerung.....	88
7	Zusammenfassung.....	90
	Summary.....	91
8	Literaturverzeichnis.....	92

Verzeichnis der Abkürzungen

% (vol/vol)	Volumenprozent (volume per volume)
% (wt/vol)	Gewichtsprozent (weight per volume)
AA	Acrylamid
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ANOVA	analysis of variance
Apaf	apoptotic protease activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser (aqua bidestillata)
Bcl-2	B-Zell-Lymphomprotein-2
BisAA	Bisacrylamid
BH 1-4	Bcl-2-Homologiedomänen 1-4
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CARD	caspase recruitment domain
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CCD	charge coupled device
CHX	Cycloheximid
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	fas associated domain with DD
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)

Verzeichnis der Abkürzungen

FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
x g	x-fache Erdbeschleunigung
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
H	Hypoxie
H ₂ O	Wasser
HAPs	Hypoxie-assoziierte Proteine
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HRP	Horseradishperoxidase
HUVEC	humane Nabelschnurvenenendothelzellen
IgG	Immunglobulin G
JNK	jun amino terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LDH	Laktatdehydrogenase
LSM	laser scanning microscope
M199	Medium 199
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPK~P	phosphorylierte MAPK
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MEK	MAPK-Kinase
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
N	Normoxie
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NCS	neonatales Kälberserum (neonatal calf serum)
NFKB	nuclear factor kappa B
NS	Nonsense

Verzeichnis der Abkürzungen

O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonale Antikörper
PAEC	porcine Aortenendothelzellen
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD 98059	2'-Amino-3'-methoxyflavon
PDK	phosphoinositide dependent kinase
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pAk	polyklonaler Antikörper
P _{O₂}	Sauerstoffpartialdruck
PKA	Proteinkinase A
Raf	rapid accelerating fibrosarcoma
Ras	rapid accelerating sarcoma (kleines G-Protein)
RCEC	koronare Rattenendothelzellen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung
SDS	Natrium(Sodium)-Dodecylsulfat
t-bid	truncated bid
TAE	Tris-EDTA-Acetat
TBS	trisgepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNF receptor associated protein with death domain
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand

Verzeichnis der Abkürzungen

TRAIL-R	TNF related apoptosis inducing ligand receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomet
U/ml	Units/ml
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Endothelzellen sind als erste Verteidigungslinie der Gefäßwand einer Vielzahl an Stressoren ausgesetzt, die letztendlich zu einer Endotheldysfunktion führen können (Moncada et al. 1997). Niedriger Sauerstoffpartialdruck (P_{O_2}) des Blutes stellt einen der häufigsten Stressfaktoren dar. Beispielsweise sind Endothelzellen der pulmonalen Arterie ständig dem niedrigen Sauerstoffpartialdruck des venösen Blutes von 35-45 mmHg ausgesetzt. Unter pathologischen Bedingungen werden diese Werte noch weit unterschritten, daher ist es überlebenswichtig, dass Endothelzellen über eine gewisse Hypoxietoleranz verfügen. Tatsächlich verfügen Endothelzellen im Vergleich zu anderen Zellarten über eine erhebliche Toleranz gegenüber hypoxischem Stress (Schwartz et al. 1984, Noll et al. 1990, Sheridan et al. 1993, Tretyakov und Farber 1995, Stempien-Otero et al. 1999). Diese Toleranz wurde in der Vergangenheit hauptsächlich der Fähigkeit von Endothelzellen zugeschrieben, unter hypoxischen Bedingungen ihren Energiestoffwechsel und damit ihr Phosphorylierungspotential aufrecht halten zu können (Buderus et al. 1989, Mertens et al. 1991, Richards et al. 1991, Tretyakov und Farber 1995). Diese metabolische Anpassungsfähigkeit der Endothelzellen mag eine hinreichende Erklärung für den Schutz vor nekrotischem Zelltod sein, nicht aber für den gleichermaßen bestehenden Schutz vor Apoptose, denn diese Form des Zelltodes ist ein energieabhängiger Prozess, wodurch Endothelzellen mit ihrer ausgeglichenen Energiebilanz ganz besonders gefährdet sein müssten. Dennoch zeigen Endothelzellen auch gegen den apoptotischen Zelltod eine höhere Toleranz als andere Zellen (Stempien-Otero et al. 1999). Die dieser Studie zugrunde liegende Hypothese war, dass Endothelzellen über einen endogenen Hypoxie-induzierten Mechanismus verfügen, der sie vor dem apoptotischen Untergang schützt. Ziel dieser Studie war es, zentrale Elemente dieses Signalweges zu identifizieren und näher zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Aufgaben und Bedeutung des Endothels

Das Endothel kleidet als einschichtige Zell-Lage die Innenwand aller Lymph- und Blutgefäße sowie der Herzkammern aus. Dabei erfüllt es in den verschiedenen Gefäßprovinzen des Körpers die unterschiedlichsten Aufgaben, weshalb Endothelzellen eine funktionell heterogene Zellpopulation darstellen (Plendl et al. 1992). Den Endothelzellen gemeinsam ist jedoch die Funktion einer hochselektiven Schranke zwischen strömendem Blut und dem Gewebe. Als solche ist sie für den kontrollierten Austausch von Flüssigkeiten, Ionen und Makromolekülen sowie für die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks verantwortlich und beeinflusst so aktiv das Permeabilitätsgeschehen (van Hinsbergh 1997). Darüber hinaus übernimmt das Endothel eine Vielzahl weiterer Steuerungsaufgaben im Organismus. So ist es maßgeblich an der Regulation von Gefäßtonus (Furchgott und Zawadzki 1980), Entzündungsreaktionen, sowie Angiogenese und Gefäßwandreparatur (Folkman und Klagsbrun 1987; Sumpio et al. 2002) beteiligt. Als erste Verteidigungslinie der Gefäßwand ist es allerdings auch das erste Ziel vieler vaskulärer Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Entzündung, Zigarettenrauch (Raveendran et al. 2005) oder Hypoxie. All diese Risikofaktoren können letztendlich zur Dysfunktion des Endothels führen. Vor dem Hintergrund, dass den häufigsten Zivilisationskrankheiten der westlichen Industrieländer wie Arteriosklerose, Bluthochdruck, Schlaganfall und Herzinfarkt eine gestörte Endothelfunktion vorausgeht, wird deutlich, wie lebensnotwendig die funktionelle Integrität des Endothels für den Organismus ist.

2.2 Hypoxie im Endothel

Zellen und Gewebe sind häufig erniedrigten Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt, so dass die Anpassungsfähigkeit von Zellen an hypoxische Bedingungen für deren Überleben essentiell ist. Durch ihre Lokalisation direkt am strömenden Blut sind Endothelzellen ganz besonders großen Po_2 -Schwankungen ausgesetzt. Endothelzellen verfügen im Vergleich zu anderen Zellen des Gewebes, wie z. B. Kardiomyozyten, Hepatozyten, Neurone und glatte Muskelzellen, über eine ausgeprägte Anpassungsfähigkeit an akute und chronische hypoxische Bedingungen (Schwartz et al. 1984, Noll et al. 1990, Graven et al. 1993, Sheridan et al. 1993,

Tretyakov und Farber 1995, Stempien-Otero et al. 1999). In der Vergangenheit wurde diese Hypoxietoleranz im Wesentlichen für ein energieabhängiges Phänomen gehalten (Buderus et al. 1989) und wurde auf die Fähigkeit von Endothelzellen zurückgeführt, unter hypoxischen Bedingungen die intrazellulären Gehalte an ATP und GTP und damit ihr Phosphorylierungspotential aufrecht halten zu können (Mertens et al. 1991, Richards et al. 1991, Aaronson et al. 1995, Tretyakov und Farber 1995). Durch die ausgeglichene Energiebilanz sind Endothelzellen, im Gegensatz zu anderen Zellen, in der Lage ihr Phosphorylierungspotential sowie ihre Membranintegrität unter hypoxischen Bedingungen aufrechtzuerhalten. Weiterhin wurde die Hochregulation von so genannten Hypoxie-assoziierten Proteinen beschrieben, bei denen es sich um glykolytische Enzyme handelt, die durch Steigerung der anaeroben Energieproduktion die endotheliale Hypoxietoleranz längerfristig verstärken können (Zimmerman et al. 1991; Graven et al. 1993; Graven et al. 1994; Aaronson et al. 1995). Diese langfristige metabolische Anpassungsfähigkeit der Endothelzellen mag den Schutz der Endothelzellen vor nekrotischem Zelltod durch Hypoxie hinreichend erklären. Endothelzellen zeigen aber auch eine erhöhte Resistenz gegenüber einem apoptotischen Zelltod, der durch niedrige P_{O_2} in hypoxieempfindlichen Zellen ausgelöst werden kann. Da diese Form des Zelltodes ein energieabhängiger Prozess ist, liegt die Vermutung nahe, dass die ausgewogene Energiebilanz der Endothelzellen hierfür einen ganz besonderen Risikofaktor darstellt. Im Gegensatz dazu ist jedoch schon seit Langem bekannt, dass Hypoxie in Endothelzellen erst nach 48-stündiger Exposition zu signifikanter Apoptose führt (Stempien-Otero et al. 1999). Aufgrund dieses Gegensatzes ist es von Interesse, die bislang bekannten Mechanismen näher zu betrachten, die Hypoxie in Endothelzellen induzieren können.

Allem voran ist hier die pro-proliferative Wirkung von Hypoxie zu nennen. Hypoxie wird in verschiedenen experimentellen Modellen als pro-angiogener und proliferativer Stimulus im Endothel beschrieben (Liu et al. 1995; Phillips et al. 1995). Diese Wirkung wird durch zwei Signalwege vermittelt:

Zum einen führt chronische Hypoxie zur Aktivierung und Stabilisierung des *Hypoxie-induzierbaren Faktors* (HIF), einem Transkriptionsfaktor aus der Familie der *basic-helix-loop-helix* Proteine. Nach Aktivierung bindet HIF an die Hypoxie-sensitiven DNA-Elemente und löst die Expression so genannter *Sauerstoff* (O_2) *regulierter Gene* aus (Wang und Semenza 1993). HIF aktiviert auf diese Weise die

Transkription einer Vielzahl an Genen, die den Zellen eine Adaptation an eingeschränkte O₂-Bedingungen ermöglicht. Auf diese Weise wird durch HIF in den Gewebezellen die Expression von VEGF (Vascular endothelial growth factor) verstärkt (Liu et al. 1995; Levy et al. 1995), welches auf parakrinem Weg eine Angiogenese auslösen kann. Diese parakrine Signalantwort ist allerdings ein langsamer Prozess, der erst nach 12 Stunden Hypoxie zur Expression des proliferativ wirksamen VEGF führt (Namiki et al. 1995).

Weiterhin wurde ein von HIF unabhängiger, Hypoxie-induzierbarer Proliferationsmechanismus beschrieben. Dieser Mechanismus wurde auf die autokrine Wirkung von Adenosin zurückgeführt, welches unter Hypoxie von allen Zellen des kardiovaskulären Systems freigesetzt wird (Meininger et al. 1988; Meininger und Granger 1990). In neueren Studien wurde eine weitere autonome Proliferationsantwort beschrieben, mit der Endothelzellen, unabhängig von HIF und VEGF, auf einen Wechsel des O₂-Angebots reagieren (Schäfer et al. 2003a; Schäfer et al. 2003b). Bei dieser Proliferationsantwort spielen mitochondrial gebildete *reaktive Sauerstoffspezies* (ROS) eine wesentliche Rolle, die unmittelbar mit dem Einsetzen der Hypoxie gebildet werden und die *extrazellulär-regulierte Kinase 2* (ERK2) aktivieren. Als ein weiteres Signalelement wurde die NADPH Oxidase identifiziert, die über ERK2 stimuliert wird und gemeinsam mit ERK2 über eine so genannte Koaktivierung den Zellzyklus der Endothelzellen aktiviert. Hypoxie kann demzufolge auf verschiedenen Wegen eine Proliferation der Endothelzellen auslösen. Dabei handelt es sich einerseits um eine Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren und Aktivierung der Expression von Wachstumsfaktoren, die Endothelzellen auf parakrinem Weg stimulieren und andererseits um die Aktivierung von endogenen Signalmechanismen, die die Endothelzellproliferation autonom über ROS, ERK2 und NADPH Oxidase auslösen (Schäfer et al. 2003a).

Neben diesen pro-proliferativen Mechanismen kann Hypoxie aber auch anti-apoptotische Signalwege induzieren. So wurde an Tumorzellen gezeigt, dass chronische Hypoxie auf eine bereits bestehende Apoptose anti-apoptotisch wirkt (Hamasu et al. 2005). In diesem Zusammenhang wurden eine Vielzahl an Signalwegen identifiziert, welche durch Hypoxie beeinflusst werden können. Dabei handelte es sich vorwiegend um die klassischen Wege von HIF/VEGF (Unruh et al. 2003; Chung et al. 2004). Darüber hinaus wurde aber auch die Hypoxie-induzierte Aktivierung von ERK- und PI3-Kinase/Akt-abhängigen Signalwegen (Yokoi und Fidler

2004) beschrieben. Weiterhin konnte die Hypoxie-induzierte Hochregulation der Expression anti-apoptotischer Gene, wie z.B. dem Bcl-2 (Cuisnier et al. 2003), bzw. Herabregulation der Expression von Bid und Bax (Erler et al. 2004) beobachtet werden (s. Kapitel 2.4.1).

Ein weiteres seit vielen Jahren erforschtes Gebiet ist die so genannte Prä- und Postkonditionierung im Herzen. Das grundlegende Phänomen liegt darin, dass kurze Phasen subletaler Hypoxie vor oder nach einem Ischämie/Reperfusionsgeschehen die Schädigung des Myokards deutlich vermindern können (Hausenloy und Yellon 2006). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Prä- und Postkonditionierung zur Aktivierung von Signalwegen, wie z. B. dem PI3-Kinase/Akt-Weg (Tong et al. 2000) und MEK/ERK (Ping et al. 1999), in Myokardzellen führen. Es wird angenommen, dass über diese Wege anti-apoptotische Mechanismen aktiviert werden und so der Ischämie/Reperfusionsschaden des Herzens vermindert werden kann.

Zusammengenommen zeigen diese Arbeiten, dass Hypoxie verschiedene proliferative aber auch anti-apoptotische Signalwege induzieren kann und es somit durchaus denkbar ist, dass die hohe Hypoxietoleranz der Endothelzellen auf einen endogenen anti-apoptotischen Mechanismus zurückzuführen ist, der durch Hypoxie ausgelöst wird.

2.3 Apoptose

2.3.1 Definition und Bedeutung

Physiologisch betrachtet handelt es sich bei Apoptose um die genetisch kodierte, aktive Selbstzerstörung der Zelle, die auch häufig als *programmierter Zelltod* bezeichnet wird. Phylogenetisch handelt es sich hierbei um ein altes, hochkonserviertes Phänomen, das von den niedersten Tieren, wie dem vielfach erforschten Nematoden *Caenorhabditis elegans*, über Insekten bis hin zu Säugetieren beobachtet werden kann (Wyllie 1980; Hengartner et al. 1992; Bursch et al. 1992; Yuan et al. 1993). Der aus dem griechischen stammende Begriff *Apoptose*, bedeutete ursprünglich das Absterben welker Blätter eines Baumes und wurde erstmals im Jahre 1972 geprägt (Kerr und Searle 1972). Dieser Namensgebung war die erstmalige Beschreibung der für Apoptose morphologisch typischen Phänomene,

wie Chromatinkondensation, Fragmentation des Zellkernes, Schrumpfung der Zellen, sowie die Ausstülpungen an Plasma- und Kernmembran vorausgegangen (Kerr 1971). Biochemisch betrachtet werden diese morphologischen Phänomene durch eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung von Endonukleasen steht, die die nukleare DNA in regelmäßigen Abständen von ca. 200 Basenpaaren spalten (Wyllie 1980). Diese können elektrophoretisch als so genannte *DNA-Leiter* voneinander getrennt werden und gelten als entscheidendes biochemisches Kriterium für eine Apoptose (Ellis et al. 1991). Die zellulären Bestandteile werden in so genannten *apoptotischen Körperchen* verpackt und bleiben dabei stets von Zellmembran ummantelt. Dabei bleibt die Membranintegrität bis zur endgültigen Beseitigung der apoptotischen Zelle durch Phagozytose erhalten. Da die zellulären Bestandteile nicht frei in das Gewebe gelangen, bleibt beim apoptotischen Zelluntergang eine entzündliche Reaktion aus. Dieses Kriterium kann zur Abgrenzung der Apoptose von Nekrose herangezogen werden, bei der es durch Einstrom von Wasser und Elektrolyten zum Schwellen und letztendlich zum Platzen der Zelle kommt.

Alle biologischen Prozesse, welche die gezielte Entfernung von Zellen zum Ziel haben, bedienen sich der Apoptose. Die Eliminierung überalterter, fremder oder infizierter Zellen seien als Beispiele erwähnt. Auch für die Embryonalentwicklung spielt Apoptose eine entscheidende Rolle (Vaux und Korsmeyer 1999). Eine Fehlsteuerung trägt zur Pathogenese zahlreicher Erkrankungen bei. So kann eine Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen zu Tumorentwicklung führen (Jaattela 1999), wohingegen übermäßige Apoptose zu Autoimmunerkrankungen (Lorenz et al. 2000) oder Degenerationsprozessen führen kann.

2.3.2 Signalwege der Apoptose

Apoptose kann durch eine Vielzahl an Stimuli ausgelöst werden. Hierbei können unspezifische Noxen wie Hitze, zytotoxische Chemikalien, virale und bakterielle Infektionen sowie Strahlung eine Rolle spielen. Als körpereigene Auslöser für Apoptose spielen in erster Linie Liganden und Rezeptoren der TNF α -Familie (Tumor Nekrose Faktor) eine entscheidende Rolle. Weiterhin kann Apoptose unter anderem durch Wachstumsfaktorentzug, Hypoxie, Glukokortikoide oder TGF β (Transforming growth factor) ausgelöst werden. Je nach Auslöser unterscheidet man den intrinsischen und extrinsischen Weg der Apoptose.

Der extrinsische Signalweg wird durch die Aktivierung der so genannten *Todesrezeptoren* ausgelöst. Dabei handelt es sich um Zelloberflächenrezeptoren der TNF α -Superfamilie, zu der neben den TNF-Rezeptoren auch FAS und die *TNF related apoptosis inducing ligand receptors* (TRAIL-Rs) zählen. Allen Mitgliedern dieser Familie ist eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne gemeinsam, mit deren Hilfe sie ihre spezifischen Liganden erkennen (Naismith und Sprang 1998). Durch Bindung des Liganden an den Todesrezeptor kommt es zur Trimerisierung und damit zur Aktivierung des Rezeptors. An den cytoplasmatischen Anteil des Todesrezeptors, der *death domain* (DD), können nun cytoplasmatische Proteine binden, welche ebenfalls eine DD tragen, die nun wiederum an die DD des Todesrezeptors bindet. Je nach Rezeptor handelt es sich hierbei um unterschiedliche Proteine, so bindet an die DD des Fas-Proteins das so genannte *Fas-associated protein with DD* (FADD) (Boldin et al. 1995), an die DD von TNF-R1 dahingegen bindet das *TNF receptor associated protein with death domain* (TRADD) (Hsu et al. 1995). An die assoziierten Proteine wie FADD oder TRADD kann nun die Procaspase 8 binden. Die Proteine interagieren über so genannte *death effector domains* (DED). Die Procaspase bildet gemeinsam mit FADD oder TRADD nun den *death inducing signaling complex* (DISC). Durch die Interaktion von FADD/TRADD mit der Procaspase 8 werden zwei Caspase-Domänen abgespalten, die aneinander binden. Zwei solcher Heterodimere schließlich bilden die aktive Caspase 8, wodurch die Signalkaskade in Gang gesetzt wird.

Abhängig vom Todesrezeptor und Zelltyp sind ab hier zwei verschiedene Signalwege möglich (Walczak und Krammer 2000). In Zellen, welche durch die Stimulation der Todesrezeptoren vornehmlich Caspase 8 aktivieren, kommt es zu einer direkten Aktivierung von Effektorcaspasen und letztendlich zum Zelltod. Zellen, die allein diesen Caspase-abhängigen Apoptoseweg beschreiten, werden als Typ I Zellen bezeichnet (Scaffidi et al. 1998). In Typ II Zellen hingegen, wozu auch Endothelzellen gehören, führt die rezeptorvermittelten Aktivierung der Caspase 8 alleine nicht zum apoptotischen Zelluntergang. In diesem Fall wird das Signal durch Einschaltung des Mitochondrien-abhängigen Weges verstärkt. Dieser Schritt wird durch Caspase 8 eingeleitet, die Bid, ein Mitglied der Bcl-2-Familien, spaltet. Dieses *truncated Bid* (tBid) transloziert zu den Mitochondrien und führt über die Bildung von Heterodimeren aus Bcl-2 und Bax, zwei weiteren Mitgliedern der Bcl-2-Familien (s. Kap. 2.4.1), zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren pro-apoptotischen

Faktoren (Luo et al. 1998). Damit findet der extrinsische Signalweg Anschluss an den intrinsischen Signalweg der Apoptose.

Im Zentrum der intrinsischen Signalwege der Apoptose stehen die Mitochondrien (Kroemer et al. 1997). Verschiedene Apoptosestimuli führen zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranspalt (Yang et al. 1997; Kluck et al. 1997). Zentrale Regulatoren dieser Freisetzung sind die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie (s. Kap. 2.4.1). Zu Beginn kann ein Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\Psi$ festgestellt werden. Dieser Verlust des Membranpotentials beruht auf einer plötzlichen Zunahme der Durchlässigkeit der inneren mitochondrialen Membran und wird durch das Öffnen der Poren der Mitochondrienmembran gekennzeichnet (Bernardi et al. 1999). Diese führt schließlich zur Freisetzung verschiedener proapoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranspalt. Neben Cytochrom c werden unter Anderem Procaspase 9 und 2 sowie der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) freigesetzt. Cytochrom c bindet nun monomerisch an den *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1) (Zou et al. 1997), welcher sich nun ATP-abhängig durch Konformationsänderungen zum Apoptosom assembliert. Die eine *caspase recruitment domain* (CARD) tragende Procaspase 9 kann nun an Apaf-1 binden und wird so aktiviert (Acehan et al. 2002). Diese wiederum initiiert die Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 (Slee et al. 1999).

2.3.3 Caspasen

Die Bezeichnung *Caspase* wird abgeleitet von Cystein-abhängige Aspartat spezifische Proteasen (Alnemri et al. 1996). Es handelt sich hierbei um eine Enzymfamilie, der im apoptotischen Signalnetzwerk eine zentrale Rolle zukommt. In Säugetieren wurden bisher 14 verschiedene Caspasen charakterisiert, wobei Caspase 11 und 12 lediglich in der Maus nachgewiesen werden konnten. Caspasen werden als inaktive Zymogene synthetisiert, welche an ihrem N-Terminus eine Prodomäne tragen, woran sich eine kurze und eine lange Domäne anschließen. Zur Aktivierung werden die kurzen und die langen Untereinheiten voneinander gespalten. Die Prodomäne kann, muss aber nicht zwingend abgespalten werden. Ein Heterotetramer aus jeweils zwei kurzen und zwei langen Untereinheiten bildet letztendlich das aktive Enzym (Wilson et al. 1994; Blanchard et al. 1999).

Prinzipiell können die Caspasen in zwei Gruppen unterteilt werden: Caspase 1, 4, 5, 11 und 12 sind hauptsächlich in entzündliche Geschehen involviert. Die restlichen bekannten Caspasen hingegen sind maßgeblich am apoptotischen Zelltod beteiligt (Slee et al. 1999) und lassen sich in die Gruppen der Initiatorcaspasen und die der Effektorcaspasen unterteilen. Die Aktivierung der Initiatorcaspasen zieht eine Kaskade nachfolgender Caspase-Aktivierungen nach sich. Vereinfacht aktiviert Caspase 8 die Caspase 3, welche wiederum Caspase 6 aktiviert. Caspase 9 aktiviert der Reihe nach Caspase 3, 6 und 7. Bei dieser Betrachtung darf aber nicht vernachlässigt werden, dass es sich hier um ein außerordentlich komplexes Netzwerk handelt, in dem es vielfach zu weiteren Interaktionen sowohl zwischen den Caspasen als auch mit anderen regulatorischen Molekülen kommt. So kann z.B auch Caspase 3 die Caspase 9 aktivieren, genau so wie Caspase 6 im Stande ist Caspase 3 zu spalten (Chang und Yang 2000). Die Effektorkaskaden führen letztendlich durch Spaltung verschiedener Substrate zum Zelltod. So führt die Zerstörung von Lamin A und B1 durch Caspase 6 zur Fragmentierung des Zellkerns (Chang und Yang 2000). Weiterhin wird neben vielen weiteren Proteinen die DNase CAD (Caspase aktivierte DNase) (Wyllie 1998; Enari et al. 1998) durch Caspase 3 aktiviert.

2.4 Beeinflussung der apoptotischen Signalwege

2.4.1. Bcl-2-Familie

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation mitochondrial vermittelter Apoptose (Gross et al. 1999). Der Namensgeber der Familie Bcl-2 (B-Zell-Lymphomprotein-2) wurde als erstes Onkogen beschrieben, das in der Lage war, Apoptose zu inhibieren (Tsujimoto et al. 1984). Überexpression dieses Gens führte im Gegensatz zu den bis dahin bekannten Onkogenen nicht über unkontrollierte Proliferation, sondern über vermehrten Schutz vor Apoptose zu Tumorbildung (Vaux et al. 1988). Aufgrund starker Sequenzhomologien wurden in der Zwischenzeit bis zu 30 weitere Familienmitglieder identifiziert. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie ähneln sich alle in zumindest einer der vier Bcl-2-Homologiedomänen BH1 bis BH4. Zu dieser großen Genfamilie gehören unter anderem neben Bcl-2 selber weitere anti-apoptotische Familienmitglieder wie

Bcl-x_l (Boise et al. 1993), Bcl-w (Gibson et al. 1996) und Mcl-1 (Kozopas et al. 1993). Sie alle verfügen, bis auf wenige Ausnahmen, über alle vier Homologiedomänen. Die pro-apoptotischen Gegenspieler können wiederum in zwei Subtypen unterteilt werden. Bcl-x_s, Bax (Oltvai et al. 1993), Bak (Kiefer et al. 1995; Chittenden et al. 1995) und Bok (Hsu et al. 1997) verfügen alle über die Homologiedomänen BH1 bis BH3, wohingegen die so genannten *BH3-only Proteine* wie z.B. Bid (Wang et al. 1996), Bad (Yang et al. 1995) und Bim lediglich über die kurze, aus 9 Aminosäuren bestehende, BH3 Domäne verfügen.

Einige der Bcl-2-Familienmitglieder sind in ihrer intrazellulären Lokalisation festgelegt. So ist z.B. das anti-apoptotische Bcl-2 an der äußeren mitochondrialen Membran, am endoplasmatischen Retikulum und perinukleär zu finden (Chen-Levy et al. 1989; Krajewski et al. 1993). Im Gegensatz dazu sind Bax und Bid zunächst zytosolische Proteine, die erst nach Aktivierung an die Mitochondrien transloziert werden (Li et al. 1998; Goping et al. 1998; Luo et al. 1998). Eine der wichtigsten Fähigkeiten der Mitglieder der Bcl-2-Familie ist ihre Eigenschaft, mit Hilfe der BH-Domänen untereinander Mono- oder Heterodimere zu bilden, was das Schicksal der Zelle maßgeblich bestimmt (Walker et al. 1995; Yang und Korsmeyer 1996; Reed 2000). Beispielsweise bewirkt die Bildung von Bcl-2/Bcl-2 Homodimeren Schutz vor Apoptose. Kommt es aber zu vermehrter Expression des Gegenspielers Bax, kann es zur Bildung von Bcl-2/Bax Heterodimeren oder Bax/Bax Homodimeren kommen, die den apoptotischen Zelltod begünstigen (Oltvai et al. 1993; Krajewski et al. 1993). Auch andere proapoptotische Familienmitglieder wie Bad und Bcl-Xs entfalten ihre pro-apoptotische Wirkung über kompetitive Dimerisierung mit anti-apoptotischen Proteinen. Ob eine Zelle dem apoptotischen Zelltod erliegt oder nicht, wird durch die Mengenverhältnisse von pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen Signalen bestimmt (Korsmeyer et al. 1993; Oltvai et al. 1993). Offensichtlich sind die in der mitochondrialen Membran lokalisierten Mitglieder der Bcl-2-Familie in der Lage, über die Regulation der Membranpermeabilität die Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen wie Cytochrom c aus dem Intermembranspalt zu beeinflussen (Tsujimoto et al. 1984; Nguyen et al. 1993; Tanaka et al. 1993; Krajewski et al. 1993; Ravagnan et al. 2002). Dem proapoptotischen Bax und Bid, aber auch den anti-apoptotischen Mitgliedern Bcl-2 und Bcl-x_l, wurde die Fähigkeit nachgewiesen, Kanäle in synthetischen Membranen zu bilden (Tanaka et al. 1993; Schendel et al. 1997; Antonsson et al. 1997; Minn et al. 1997). Die Membran-assoziierten Bcl-2-

Familienmitglieder können so die Permeabilität der Mitochondrienmembran und damit die Ausschüttung der pro-apoptotischen Stimuli wie Cytochrom c und Caspase 9 beeinflussen.

Das pro-apoptotische Familienmitglied Bad, dem in der vorliegenden Arbeit eine besondere Bedeutung zukommt, gehört zu der Untergruppe der so genannten *BH3-only-Proteine*, die mit ihrer α -helikalen BH3 Domäne an anti-apoptotische Bcl-2-Familienmitglieder binden und diese dadurch kompetitiv hemmen. Durch diese Antagonisierung der anti-apoptotischen Familienmitglieder entfalten sie ihr apoptotisches Potential. In Wachstumsfaktor stimulierten Zellen ist Bad an mehreren Stellen phosphoryliert, wodurch es an das Strukturprotein 14-3-3 bindet und somit inaktiv vorliegt (Zha et al. 1996). Bad verfügt über drei Phosphorylierungsstellen, welche durch verschiedene Kinasen phosphoryliert werden. Es wurde beschrieben, dass Bad durch Akt an der Phosphorylierungsstelle Serin 136 (del Peso et al. 1997; Datta et al. 1997) phosphoryliert wird. Weiterhin wurde jeweils eine spezifische Bindungsstelle für Proteinkinase A (Serin 155) sowie für ERK 1/2 (Serin 112) beschrieben (Fang et al. 1999; Scheid et al. 1999; Lizcano et al. 2000). Entzug von Wachstumsfaktoren führt zu einer Akkumulation dephosphorylierten Bads, welches von 14-3-3 dissoziiert (Zha et al. 1996). Dadurch kann es nun an die anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bcl-2 und Bcl-xl binden und auf diese Weise kompetitiv hemmen. Dadurch wird das empfindliche Gleichgewicht auf die Seite der Apoptose verschoben und die Apoptosemaschinerie durch Freisetzung von Cytochrom c in Gang gesetzt.

2.4.2 MAPK

Die zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen gehörenden MAP-Kinasen sind an nahezu allen regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt (Chang und Karin 2001). Die Besonderheit dieser Kinasen liegt darin, dass sie durch verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert werden können, so dass die Zellen auf viele unterschiedliche Signale reagieren können (Kyriakis und Avruch 2001). Diese Signale können Hormone und Wachstumsfaktoren, vasoaktive Peptide, Zytokine, Stress, osmotischer Schock, ionisierende Strahlung, Ischämie, Hypoxie und vieles mehr sein. Auf diese Weise können mannigfaltige Geschehen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose durch MAP-Kinasen beeinflusst werden (Kyriakis und Avruch 2001; Schramek 2002). In Säugetieren lassen sich zum heutigen Stand der

Dinge drei Gruppen unterscheiden: Die *extrazellulär-regulierten Kinasen* (ERK), die *Jun amino terminal kinases* (JNK) sowie die *p38 Kinasen*, auch *Stress-aktivierte Proteinkinasen* (SAPK) genannt. Die Aktivität aller MAP-Kinasen (MAPK) wird über ein dreistufiges Kaskadensystem reguliert, welches sich nacheinander durch Phosphorylierung aktiviert. Diese Kaskaden bestehen stets aus einer MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase, oder MEK-Kinase), der MAPKK (MAP-Kinase-Kinase, MKK oder MEK) sowie der MAP-Kinase (Robinson und Cobb 1997; English et al. 1999).

Die extrazellulär regulierten Kinasen ERK1 und ERK2 werden entsprechend ihrer Größe in kDa auch als p44 und p42 MAPK bezeichnet (Liebmann 2001). Die ERK werden hauptsächlich durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren aktiviert, was zur Aktivierung von *Rezeptortyrosinkinasen* (RTK) und so zur Aktivierung des Rezeptors führt. Dadurch wird über das G-Protein *Ras* (rapid accelerating sarcoma) die MAPKKK *Raf* (rapid accelerating fibrosarcoma) phosphoryliert, welche nachfolgend MAPKK MEK1/2 aktiviert, die wiederum p42/p44 MAPK durch Phosphorylierung aktiviert (Cobb und Goldsmith 1995; English et al. 1999). Nur in dieser phosphorylierten Form können die ERK in den Zellkern wandern. Durch Stimulation der Nukleotidsynthese, Phosphorylierung von Translations- und Transkriptionsfaktoren, sowie VEGF-Expression entfalten die ERK ihre mitogenen Effekte. Neben diesem Aktivierungsweg über RTK können MAPK auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden, wodurch ERK nicht nur durch Wachstumsfaktoren und Hormone, sondern auch durch Peptide, Neurotransmitter oder biogene Amine aktiviert werden können (Short et al. 2000; Liebmann 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass ERK1/2 neben diesen klassischen Rezeptor-vermittelten Wegen auch durch Stimulation durch ROS, wie sie beispielsweise unter Hypoxie entstehen, aktiviert werden kann (Samavati et al. 2002; Schäfer et al. 2003). Neben seiner mitogenen Wirkung hat ERK1/2 auch eine anti-apoptotische Wirkungskomponente. Beispielsweise kann über den MEK/ERK Signalweg der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert werden, worüber dann anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_l und Mc1 exprimiert werden können. Weiterhin kann ERK1/2 Bad an dessen Phosphorylierungsstelle Serin 112 phosphorylieren und damit inaktivieren (Fang et al. 1999; Scheid et al. 1999).

2.4.3 Der Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) wird, wie auch der MAPK/ERK-Signalweg, über Wachstumsfaktorrezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. Das am besten untersuchte Substrat der PI3-Kinase ist die Proteinkinase B oder Akt. Diese Serin/Thyrosinkinase ist maßgeblich an der Regulation von Zellproliferation und Apoptose beteiligt (Coffer et al. 1998). Die PI3-Kinase phosphoryliert neben anderen Substraten Phosphatidylinositol. Dieses übernimmt nun eine Adapterfunktion indem es Akt bindet und so an die Zellmembran rekrutiert. Das membranassoziierte Akt wird nun zum Substrat für die *phosphoinositide dependent kinase* (PDK1), welche Akt phosphoryliert und damit aktiviert. Akt reguliert den Glukosehaushalt und die Proteinsynthese der Zelle. Neben proliferativen Eigenschaften verfügt es auch über stark anti-apoptotische Eigenschaften und kann direkt in die Regulation des intrinsischen Apoptosesignalweges eingreifen. So kann Akt über Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Bad an dessen Phosphorylierungsstelle Serin 136 anti-apoptotisch wirken. Zudem kann Akt direkt die Aktivierung der Caspase 9 hemmen (Cardone et al. 1998).

Somit bildet der PI3/Akt-Signalweg gemeinsam mit dem MAPK/ERK-Signalweg ein kompliziertes Signalnetzwerk, das sowohl Proliferation als auch Apoptose maßgeblich beeinflussen kann.

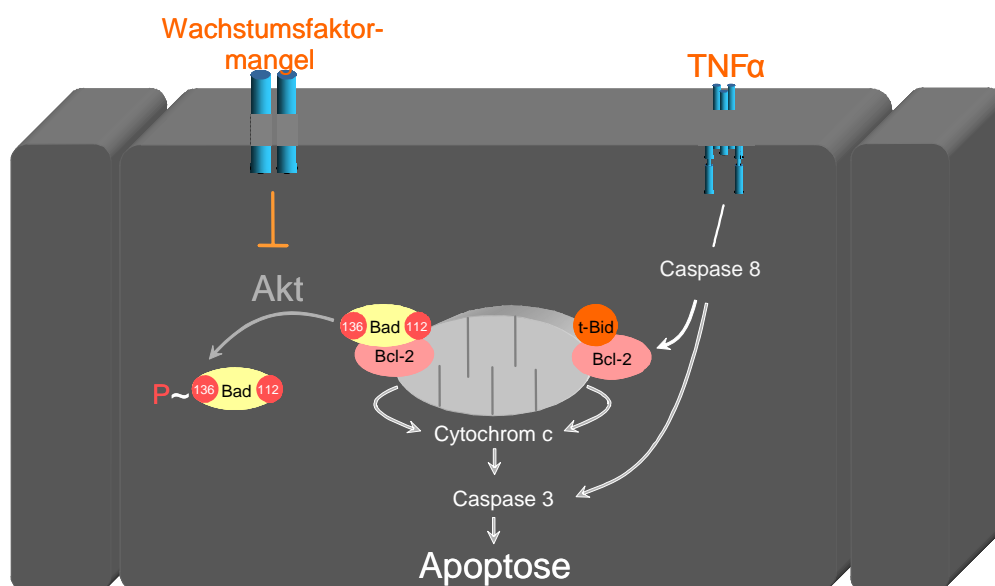


Abb. 2.1: Vereinfachtes Schema der apoptotischen Signalwege

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Endothelzellen verfügen im Vergleich zu anderen Zellarten über eine extreme Hypoxietoleranz. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese war, dass Endothelzellen über einen endogenen Hypoxie-induzierten Mechanismus verfügen, der sie vor dem apoptotischen Zelluntergang schützt. Die hier vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, diesen Mechanismus näher zu identifizieren und damit grundlegendes Verständnis für die Selbstschutzmechanismen der Endothelzellen gegen apoptotischen Zelltod zu erlangen.

Dabei wurde im Einzelnen folgenden Fragestellungen nachgegangen:

- Kann Hypoxie einen Schutz vor Zelltod in Endothelzellen induzieren?
- Vor welcher Form des Zelltodes kann Hypoxie schützen?
- Kann Hypoxie extrinsisch und intrinsisch induzierte Apoptose gleichermaßen beeinflussen?
- Welche Rolle spielt der MEK/ERK-Signalweg bei der anti-apoptotischen Wirkung der Hypoxie?
- Welche Rolle spielt der PI3-Kinase/Akt-Signalweg bei der anti-apoptotischen Wirkung von Hypoxie?
- Wie kann Hypoxie in den apoptotischen Signalweg eingreifen?

3 Material

3.1 Chemikalien

3.1.1 Vielfach verwendete Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitogen, Paisley, Großbritannien
6-Aminohexansäure	Merck-Suchard, Hohenbrunn
APS	Serva, Heidelberg
Basic Fibroblast Factor	Promocell, Heidelberg
Benzonase®	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen®	Messer Griesheim, Krefeld
Collagenase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Cycloheximid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
DTT	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ECL-Entwicklerreagenz (=SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate)	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
EDTA-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Endothelial Growth Medium Kit	Promocell, Heidelberg
Ethanol	Riedel de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HBSS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Material

HEPES	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Medium 199/Earl's Salts	Gibco BRL, Eggenstein
Magnesiumchlorid	Fluka, Neu-Ulm
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel de Haën, Seelze
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriummonovanadat	Merck, Darmstadt
NCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Ponceau S Solution	Serva, Heidelberg
SDS	Merck, Darmstadt
Stickstoff (100%)	Air Liquid, Krefeld
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Amersham, Braunschweig

3.1.2 Agonisten und Inhibitoren

PD 98059	Calbiochem, Bad Soden
TNF α	R&D Systems, Minneapolis, USA

3.1.3 Antisense- und Sense-Oligonukleotide

Oligonukleotide, welche mit Phosphothionat geschützt sind, wurden zur Unterscheidung klein geschrieben. Zur Transkriptionskontrolle wurden Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide verwendet.

Antisense Fluo ERK 1/2	Invitrogen, Karlsruhe
------------------------	-----------------------

Sequenz: Gcc gcC GCC GCC gccAT

Nonsense Fluo ERK 1/2	Invitrogen, Karlsruhe
-----------------------	-----------------------

Sequenz: Cgc gcG CTG GCG caccC

3.1.4 Molekulargewichtsmarker

Laktat-Dehydrogenase-Marker	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
-----------------------------	-----------------------------------

Molekulargewichtsmarker	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
-------------------------	-----------------------------------

3.1.5 Antikörper

Anti-Kaninchen-IgG (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
---------------------------------------	--------------------------------

Anti-Kaninchen-IgG (FITC-gekoppelt)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
--	-----------------------------------

Anti-Maus-IgG (HRP-gekoppelt)	Amersham Biosciences, Freiburg
----------------------------------	--------------------------------

Anti-Ziege-IgG (HRP-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
-----------------------------------	------------------

Anti-Akt, mAkt, Maus IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
--------------------------	------------------------------

Anti-Akt~P, pAkt, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
---------------------------------	------------------------------

Anti-Bad, mAkt, Maus IgG (Clone-7)	Cell Signaling, Danvers, USA
---------------------------------------	------------------------------

Anti-Bad~P, pAkt, Kaninchen IgG	Cell Signaling, Danvers, USA
---------------------------------	------------------------------

Anti-Caspase 3, pAkt, Ziege IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA
---------------------------------	-------------------------------

Anti-Caspase 3 aktiv, mAkt, Maus IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA
--------------------------------------	-------------------------------

Material

Anti-p42 MAPK pAk, Kaninchen IgG (=Anti-ERK2 C-14),	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Anti-Vinculin, mAk, Maus IgG (hVIN-1)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

3.1.6 Verwendete Kits

Annexin V-FITC-Apoptosis Detection Kit1 [®]	BD Pharmingen
FITC-BrdU-Flow-Kit [®]	BD Pharmingen

Alle übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) bezogen und waren von höchster erhältlicher Qualität. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

3.2 Geräte und Laborbedarf

3.2.1 Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Sterilbank	Typ: Lamin Air HBB 2472, Heraeus, Hanau
Brutschrank	Typ: Cytoperm, Heraeus, Hanau
Mikroskop	Typ: TMS-F, Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March-Hugstetten
Perfusionsanlage	Eigenbau Werkstatt Physiologisches Institut, JLU Gießen

3.2.2 Gelelektrophorese

Netzgeräte	Typ: High Voltage Power Pack P30, Biometra, Göttingen Typ: EPS 3501 XL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophoresekammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Elektroblotkammern	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
CCD Kamera für Westernblot Analysen	Bio Rad, Hercules, USA

3.2.3 Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizblock	Techne, Burkhardtsdorf
Magnet-Heizrührer	IKA-Werke, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Schüttler	Typ: WT 12, Biometra, Göttingen

Material

Vortexer	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifuge	Typ: Biofuge 15R, Heraeus, Hanau
FACS Calibur®	BD Bioscience, Heidelberg
Durchflusszytometer	
Hypoxie-Kammern	Eigenbau Werkstatt Physiologisches Institut, JLU Gießen
Photometer	Pharmacia Biotec, Freiburg
Horizontale Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
UV-Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Konfokales Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen

3.2.4 Verbrauchsmaterialien

Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Primaria-Zellkulturschalen	Typ: Falcon 353803, Becton Dickinson, Heidelberg
Nitocellulosemembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5/2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Röhrchen, 10 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, 50 ml	Typ: Falcon: 352070, Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Sartorius, Göttingen
Trockenpapier	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Zellkulturschalen	Typ: Falcon 353001, Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Typ: Falcon 353087, Becton Dickinson, Heidelberg

Material

Coverslip-Glasplättchen	Menzel, Braunschweig
FACS Messröhrchen	BD-Pharmingen, Heidelberg
FACS Flow	BD-Pharmingen, Heidelberg

3.2.5 Auswertung

Microsoft Excel 2000	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2000	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows XP	Microsoft Corp., USA
Quantity One	Molecular Dynamics, Krefeld
Cell-Quest-Pro	BD-Pharmingen, Heidelberg
LSM 510	Carl Zeiss AG, Oberkochen
SPSS	SPSS Inc., Chicago, USA

4.1.1 Isolierung von Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene

HBSS gebrauchsfertig

HBSS	x ml
Collagenase II, 293 Units/mg (wt/vol)	0,025%
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,5 mM
CaCl ₂	1,5 mM

30

4.1.2 Isolierung von Endothelzellen aus dem Rattenherzen

Die Endothelzellen wurden aus männlichen adulten Wistarratten isoliert. Die Tiere stammten aus der hauseigenen Züchtung des Tierstalls des Physiologischen Instituts der JLU Gießen.

Folgende Lösungen wurden für die Präparation von RCEC benötigt:

Powell-Medium:

NaCl	110,0 mM
KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
MgSO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	25,0 mM

Collagenase-Puffer:

Powell-Medium	x ml
Collagenase II (293 units/mg)(wt/vol)	0,025%
CaCl ₂ (100 mM)	0,03%

Vor der Präparation wurde die Perfusionsanlage mit Powell-Medium gespült, befüllt und auf 37°C vorgewärmt. Zur Konstanthaltung des pH-Wertes wurde das Medium mit Carbogen begast.

Nachdem die Ratten mittels CO₂ narkotisiert und durch Genickbruch getötet worden waren, wurde der Thorax eröffnet und Herz und Lunge entnommen. Das Mediastinal- und Lungengewebe wurde entfernt, die Aorta ascendens frei präpariert und an die Perfusionsanlage angehängt. Das Herz wurde nun mit Powell-Medium blutfrei gespült und für mindestens 27 Minuten mit 40 ml Collagenase-Puffer perfundiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Herz von Aorta und Vorhöfen befreit und die Ventrikel mit einem Gewebhacker zerkleinert. Der so gewonnene Zellbrei wurde in 30 ml Collagenase-Puffer für 10 Minuten nachverdaut, filtriert und bei 30 x g für 3 Minuten zentrifugiert. Der dadurch gewonnene Überstand wurde abgenommen, mit 10 µg Trypsin sowie 30 µl einer 100 mM CaCl₂-Lösung versetzt und für weitere 18 Minuten bei Carbogen-Begasung im Wasserbad verdaut. Zuletzt wurde diese

Lösung in Kulturmedium überführt, bei 180 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

4.1.3 Isolierung von Endothelzellen aus der Schweineaorta

Die zur Gewinnung porciner Aorten-Endothelzellen notwendigen Schweineaorten stammten vom Schlachthof Gießen. Es wurden ca. 20 cm lange Stücke der Aorta aus dem Geschlinge entnommen. Die Aorten wurden in 0,9%iger Kochsalzlösung gelagert und spätestens drei Stunden nach der Schlachtung verarbeitet.

Folgende Lösungen wurden zur Präparation von PAEC benötigt:

Auffangmedium:

M199	40 ml
Penicillin/Streptomycin (vol/vol)	2%

Die Aorten wurden zunächst äußerlich von Lymphknoten, Fett und anderen Anteilen des Mesenteriums befreit. Dabei blieben sie stets mit physiologischer Kochsalzlösung bedeckt. Anschließend wurden die Hauptschlagadern entlang der Gefäßabgänge mit einer Schere eröffnet und mittels Stecknadeln an einem Styroporbrett in gestrecktem Zustand fixiert. Nun wurde die so frei liegende Endothelzellschicht mit Kochsalzlösung gespült. Danach wurde die Endothelschicht vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt und in ein 50 ml Falconröhrchen mit Auffangmedium gegeben.

Zuletzt wurden die so gewonnenen Zellen 10 Minuten bei 180 x g zentrifugiert.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Lösungen in der Zellkultur

Lösungen in der Zellkultur von HUVEC

Anzuchtmedium:

Endothelial Cell Basal Medium	x ml
FCS (vol/vol)	10,0%
Penicillin/Streptomycin-Lösung (vol/vol)	2,0%
ECGS/H (wt/vol)	0,4%
Hydrocortison (wt/vol)	0,1%
Gentamycin (vol/vol)	0,1%
Basic Fibroblast Factor (wt/vol)	1 ng/ml
Epidermal Growth Factor (wt/vol)	0,1 ng/ml

Kulturmedium:

Endothelial Cell Basal Medium	x ml
FCS (vol/vol)	10,0%
Penicillin/Streptomycin (vol/vol)	2,0%
ECGS/H (wt/vol)	0,4%
Hydrocortison (wt/vol)	0,1%
Basic Fibroblast Factor (wt/vol)	1 ng/ml
Epidermal Growth Factor (wt/vol)	0,1 ng/ml

Methoden

Apoptoseinduktionsmedien:

a)

Endothelial Cell Basal Medium	x ml
Penicillin/Streptomycin	2,0%

b)

Promocell Basal Medium	x ml
FCS (vol/vol)	10,0%
Penicillin/Streptomycin (vol/vol)	2,0%
ECGS/H (wt/vol)	0,4%
Hydrocortison (wt/vol)	0,1%
Basic Fibroblast Factor (wt/vol)	1 ng/ml
Epidermal Growth Factor (wt/vol)	0,1 ng/ml
TNF α	10 ng/ml
CHX	100 ng/ml

Waschlösung:

HBSS	gebrauchsfertig
------	-----------------

Hypoxiemedium:

HBSS-Lösung	x ml
CaCl ₂	1,2 mM

Methoden

Lösungen in der Zellkultur von RCEC und PAEC

Medium 199 CO₂ (pH 7,4):

M199/Earl's Salt	9,6 g/l
HEPES	15 mM
NaHCO ₃	24 mM
Carbogen [®]	für 1 Stunde begasen

Kulturmedium:

M199/CO ₂	x ml
NCS (vol/vol)	10,0%
FCS (vol/vol)	10,0%
Penicillin/Streptomycin (vol/vol)	2,0%

Apoptose-Induktions-Medium:

M199/CO ₂	x ml
Penicillin/Streptomycin (vol/vol)	2,0%

Waschlösung (HEPES-Lösung, pH 7,4):

NaCl	125,0 mM
KCl	2,6 mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
HEPES	25,0 mM

Hypoxiemedium:

HEPES-Lösung (pH 7,4)	x ml
CaCl ₂	3,3 mM
D+ Glukose	1,2 mM

4.2.2 Ausplattieren und Kultivieren der Primärkulturen

Die durch die jeweilige Präparation gewonnenen Zellen wurden in 30 bis 50 ml des, der jeweiligen Zellart entsprechenden, Anzuchtmediums resuspendiert. In jede Primariaschale wurden 5 ml des Anzuchtmediums vorgelegt und 5 ml der Zellsuspension mäanderförmig ausplattiert. Hierbei rechnete man ca. 2-4 Schalen pro Nabelschnur, 2 Schalen pro Rattenherz bzw. 3 Schweineaorten pro Kulturschale. Nach ca. zwei Stunden Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C wurden die Zellen mit HBSS bzw. HEPES-Lösung gründlich gewaschen, um die nicht angehafteten Endothelzellen sowie Fibroblasten und Erythrozyten zu entfernen. Nach 24 Stunden wurde der Waschvorgang wiederholt und die Zellen anschließend in Kulturmedium weiter inkubiert bis die Schalen konfluent bewachsen waren.

4.3 Behandlung der Zellen

4.3.1 Anlegen der Versuchsschalen

Sobald die Petrischalen konfluent bewachsen waren, wurden sie gesplittet, um für einen Versuch genutzt werden zu können. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium von den Schalen abgesaugt und der Zellrasen mit HBSS bzw. HEPES-Lösung gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Schale gegeben und 3 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen lösten. Die so frei gewordenen Zellen wurden in ein 50 ml Falconröhrchen mit Kulturmedium überführt. Durch das im Medium enthaltene Serum wurde die Reaktion gestoppt. Nun wurden die Endothelzellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vereinzelt, mittels Neubauerkammer gezählt und in einer Dichte von $2,2 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgesät.

4.3.2 Zellkulturmodell

Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten, wurden sie zur Induktion der Apoptose entweder Serumentzug ausgesetzt oder aber mit TNF α (10 ng/ml) und CHX (100 ng/ml) behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen einer zweistündigen Hypoxie bzw. der normoxen Kontrolle ausgesetzt. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und durch Hypoxiemedium ersetzt. Anschließend wurden die Schalen in die Hypoxiekammern gesetzt und entweder mit reinem Stickstoff oder aber mit Luft für 2 Stunden bei 37°C und pH 7,5 begast. Dabei wurden in den hypoxischen Kammern Sauerstoffwerte von unter 10 mmHg erreicht. Daran schloss sich eine 24-stündige Reoxygenierungsphase an, in welcher die Zellen abermals in Hungermedium bzw. in Kulturmedium+TNF α und CHX bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert wurden.

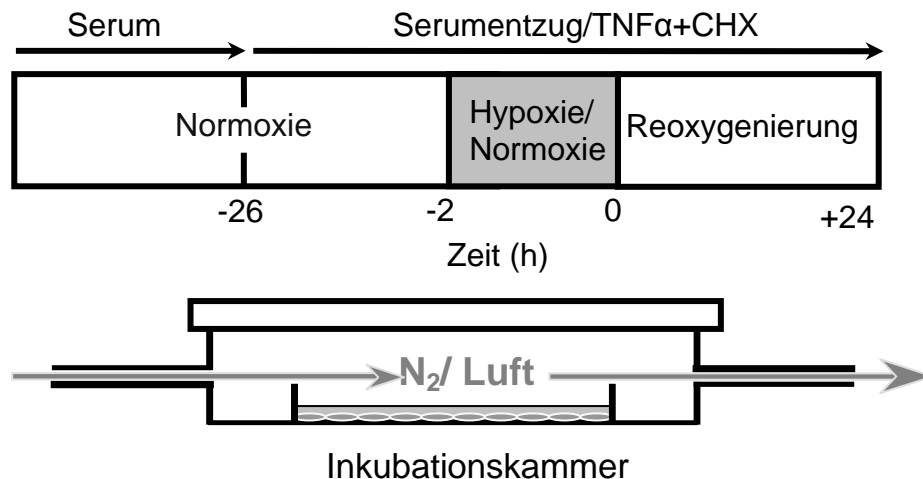


Abb. 4.1: Aufbau einer Inkubationskammer

Je nach Bedarf der Proteinmenge wurden hierbei unterschiedlich große Kulturschalen verwendet.

Durchmesser der Kulturschale	Kulturmedium	Hypoxiemedium
3,5 cm	2 ml	1 ml
6 cm	4 ml	3 ml
10 cm	10 ml	8 ml

Tabelle 4.1: Medienmengen bei Verwendung verschiedener Kulturschalen

4.3.3 Einsatz des Hemmstoffes PD 98059

Um die Rolle des MEK/ERK-Signalweges zu untersuchen, wurde ein Hemmstoff der MEK1 (PD 98059) eingesetzt. 30 Minuten vor Beginn der Hypoxie/Normoxie-Phase wurden dem Medium 20 μ M PD 98059 zugesetzt. Zusätzlich war PD im Hypoxiemedium während der Hypoxie/Normoxie anwesend. Während der Reoxygenierungsphase wurden keine weiteren Hemmstoffe zugegeben.

4.3.4 Transfektion der Endothelzellen mit Oligonukleotiden

Als Antisense (AS)-Oligonukleotide werden kurze DNA-Fragmente bezeichnet, welche aus der komplementären Sequenz einer mRNA bestehen. Werden Zellen mit diesen Sequenzen transfiziert, bilden die Oligonukleotide mit der mRNA einen Doppelstrang, so dass die mRNA nicht abgelesen und so das entsprechende Protein nicht synthetisiert werden kann. Die Antisense-Strategie bietet so eine gute Alternative zum Einsatz von Hemmstoffen, da die Wirkungsweise wesentlich spezifischer ist. Bei Nonsense (NS)-Oligonukleotiden handelt es sich ebenfalls um kurze DNA-Fragmente, welche aber zu keiner bekannten m-RNA-Sequenz passen. Sie stellen so eine Negativ-Kontrolle dar. Die Aufnahme der Oligonukleotide konnte durch die Fluoreszenzmarkierung kontrolliert werden.

Die Transfektionen wurden nur an HUVEC durchgeführt, hierfür wurden die Oligonukleotide 24 Stunden vor Beginn der Hypoxie/Normoxie-Phase, während der Hypoxie/Normoxie und während der Reoxygenierung auf die Kulturschalen gegeben. Sie wurden stets in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt.

4.4 Trypsinisierung und Zellzählung

Zur Ermittlung der Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 500 μ l Trypsin EDTA-Lösung versetzt. Nach ca. 3 Minuten ließen sich die Zellen gut lösen und wurden in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt, in welchem 500 μ l HEPES + 1,3 mM CaCl_2 vorgelegt worden waren, wodurch die Reaktion abgestoppt wurde. Nun konnte die Zellzahl durch Auszählung in einer Neubauer-Kammer ermittelt werden.

4.5 Durchflussszytometrie

Für die durchflussszytometrischen Untersuchungen wurde ein FACS Calibur® Durchflussszytometer verwendet. Dieses auf Lasertechnik beruhende Gerät kann Zellen anhand verschiedener Parameter wie Größe, Granularität sowie verschiedene Fluoreszenzen charakterisieren und so umfassende Informationen über eine Zellpopulation liefern.

4.5.1 Apoptosenachweis (AnnexinV-Propidiumiodid-Assay)

Nach Apoptoseinduktion wird durch Umstrukturierungen das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Membran transloziert und den phagozytierenden Zellen präsentiert (Fadok et al. 2001). Dieses Phänomen macht sich der AnnexinV-Propidiumiodid-Assay zunutze: Wird das Phosphatidylserinmolekül auf der Plasmamembran der apoptotischen Zelle präsentiert, kann es durch AnnexinV, einem Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin, markiert werden. Es ist allerdings zu beachten, dass diese Translokation von Phosphatidylserin auch unter nekrotischen Prozessen auftreten kann. Daher ist eine gleichzeitige Überprüfung der Zellwandintegrität durch Propidiumiodid unabdingbar. Als apoptotische Zellen sind also ausschließlich jene Zellen definiert, welche AnnexinV-positiv, aber Propidiumiodid-negativ sind (Vermes et al. 1995). Die Durchführung des AnnexinV-Propidiumiodid-Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Gewinnung der Proben

Die Zellen wurden wie unter Kapitel 4.1-4.3 beschrieben isoliert, kultiviert und behandelt. Anschließend wurden sie wie in Kapitel 4.4 beschrieben trypsinisiert und einmal mit 1 ml HBSS gewaschen.

Färbung der Zellen

AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit[®]

Annexin V-FITC

Tris/HCl (pH 8,0) 50 mM

NaCl 80 mM

EDTA 1 mM

BSA (wt/vol) 0,2%

Propidiumiodid (pH 7,4)

10 x Bindungs-Puffer:

HEPES (pH 7,4) 0,1 M

NaCl 1,4 M

CaCl₂ 25 mM

Die Zellen wurden ein mal mit 1 x PBS gewaschen, 3 Minuten bei 180 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend in 50 µl des im Annexin-Kit mitgelieferten Bindungs-Puffers resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl der Annexin- sowie 5 µl der Propidiumiodidlösung hinzugegeben und die Proben wurden nach vorsichtigem vortexen 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden 450 µl Bindungs-Puffer hinzugegeben und die Proben in FACS-Messröhrchen überführt.

Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (FACS-Analyse)

Die Proben wurden mittels eines Durchflusszytometers gemessen und unter Verwendung des dazugehörigen Softwareprogramms Cell Quest Pro[®] analysiert.

4.5.2 Zellproliferationsnachweis (BrdU-Inkorporations-Assay)

Um die Teilungsaktivität der Zellen zu überprüfen, wurde der Einbau von BrdU (Bromdesoxy-Uridin) in neu synthetisierte DNA ermittelt. Bei BrdU handelt es sich um ein Analog des DNA-Bausteins Thymidin, welcher in neu synthetisierte DNA eingebaut wird, wenn die Zelle die Synthesephase durchläuft. Dieses BrdU kann dann durch spezifische, fluoreszenzgekoppelte Antikörper angefärbt und nachgewiesen werden. Durch die gleichzeitige Färbung der gesamten DNA mit 7-AAD (7-Amino-Aktinomycin) können zweidimensionale Analysen durchgeführt werden, was die Differenzierung der einzelnen Zellzyklusphasen (G0/1, S, G2/M) ermöglicht. Die Durchführung des BrdU-Assays erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Gewinnung der Proben

Die Zellen wurden wie üblich isoliert, kultiviert und behandelt (s. Kapitel 4.1-4.3). Während der Reoxygenierungsphase wurden die Schalen mit 10 μ M BrdU inkubiert. Hierbei wurden die Zellen entweder permanent während der gesamten Reoxygenierungsphase über 24 Stunden oder aber pulsativ für jeweils zwei Stunden von Stunde 0-2, oder Stunde 12-14 oder Stunde 22-24 mit BrdU inkubiert.

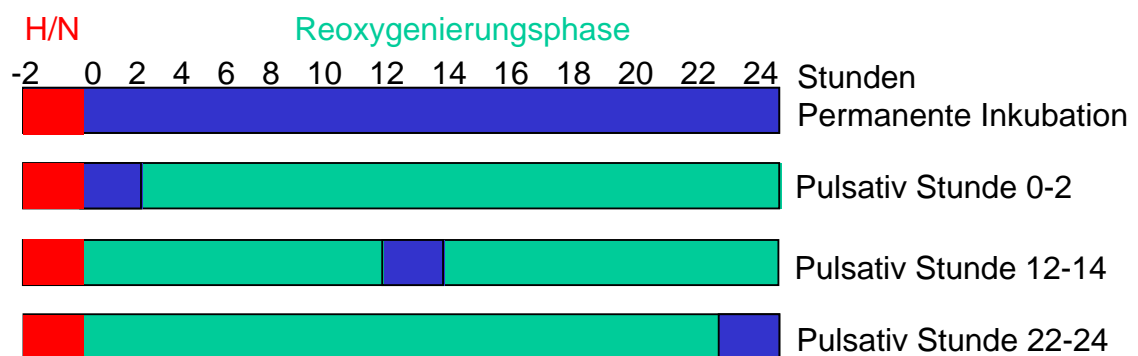


Abb. 4.2: Inkubationsphasen mit BrdU (blau) während der Reoxygenierung

Färbung der Proben

BrdU Flow-Kit®:

Fluorochrom-gekoppelter BrdU Antikörper

BD Cytofix/Cytoperm® Puffer (enthält Paraformaldehyd und Saponin)

BD Perm/Wash® Puffer (10x, enthält FCS und Saponin)

BD Cytoperm® Plus Puffer

7-AAD

BrdU (1mM)

DNAse (300 µg/ml)

Nach Inkubation der Zellen mit BrdU wurden sie einmal mit HBSS gewaschen, anschließend mit 500 µl Trypsin EDTA-Lösung von der Schale gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in welchem 50 µl FCS vorgelegt worden waren. Anschließend wurden die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen nun in 100 µl BD Cytofix/Cytoperm® Puffer resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml BD Perm/Wash® Puffer gewaschen. An dieser Stelle konnten die Proben über Nacht in Färbungs-Puffer bei 4 °C aufbewahrt werden.

Färbungs-Puffer:

PBS	x ml
FCS (vol/vol)	3%
HCl (wt/vol)	0,9%

PBS:

KCl	2,6 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
NaCl	137,9 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (pH 7,2-7,4)	8,0 mM

Als nächster Schritt folgte eine weitere Permeabilisierung der Zellen in 100 µl Cytoperm® Plus Puffer für 10 Minuten auf Eis. Nach einmaligem Waschen in

Perm/Wash[®] Puffer wurden die Proben abermals in 100 µl Cytofix/Cytoperm[®] Puffer aufgenommen und zur weiteren Fixierung 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift folgte ein einstündiger Verdau mit 30%iger DNase bei 37°C, um das eingebaute BrdU zu exponieren. Daraufhin wurden die Proben abermals gewaschen und für 20 Minuten mit 50 µl Anti-BrdU-haltigem Waschpuffer inkubiert. Zuletzt folgten nach einem letzten Waschschrift die Färbung der totalen DNA mit 7-AAD und die Analyse im Durchflusszytometer (FACS Calibur[®]), wofür ebenfalls das Softwareprogramm Cell-Quest-Pro[®] verwendet wurde.

4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Electrophorese) können Proteine ihrer relativen Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

4.6.1 Probenvorbereitung

Die Endothelzellen wurden ihrem Versuchsplan entsprechend isoliert, kultiviert und behandelt (siehe Kapitel 4.1-4.3). Nach einmaligem Waschen mit HBSS wurden die Zellen mit 150 µl 2x-Laemmli-Puffer lysiert. Diesem waren kurz zuvor 50 U/ml Benzonase[®], 10 mM DTT und 2 mM MgSO₄ zugegeben worden. Nun konnten die Zellen mittels eines Einmalschabers von der Kulturschale geschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die vollständige Denaturierung wurde durch 7-minütige Inkubation bei 65°C herbeigeführt. Die Proben standen nun zur sofortigen Verwendung zur Verfügung (s. Kap 4.6.2) oder konnten bei -20°C gelagert werden.

2x-Laemmli-Puffer (pH 6,8):

Tris/HCl	0,5 M
Glycerin (vol/vol)	25%
SDS 10%ig (wt/vol)	4%
β-Mercaptoethanol (vol/vol)	1%
Bromphenolblau (wt/vol)	0,1%

4.6.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das anionische Detergens SDS bindet an Proteine und überdeckt dadurch deren Eigenladung. Durch die Erhitzung der Proben werden die Proteine denaturiert, die Zugabe von Merkaptoethanol und DTT bricht zudem Disulfidbrücken. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich dadurch nur noch in ihrer Größe voneinander. Nun werden die negativ geladenen Proteine bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld durch ein Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurde mittels eines modifizierten, diskontinuierlichen Verfahrens durchgeführt (Laemmli 1970).

Zunächst wurden die zum Aufbau der Gelkammer benötigten Materialien gründlich gereinigt und mit 70%igem Ethanol entfettet. Das Gel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen. Hierfür wurde der Spalt zwischen den Platten auf jeder Seite durch einen Spacer begrenzt. Nach unten wurde der Spalt mit einem Gummischlauch abgedichtet. Dieser Schlauch wurde nun mit Zug auch entlang der Spacer gespannt, so dass der Spalt rundherum abgedichtet wurde. Zuletzt wurden die Platten mit Klammern an der Kammer befestigt. Nun konnte das Trenngel bis auf 2/3 der Höhe gegossen und mit Aqua bidest. überschichtet werden. Nach ca. zwei Stunden war das Trenngel vollständig polymerisiert. Nachdem das Wasser entfernt worden war, konnte nun das Sammelgel obenauf gegossen werden, der Gelkamm zur Formung der Taschen wurde sofort anschließend eingesetzt. Nach einer weiteren Stunde konnten der Gummischlauch sowie der Gelkamm entfernt und die Gelkammer in ein Gefäß mit Laufpuffer gestellt werden. Schließlich wurde die Kammer auch oben mit Laufpuffer befüllt, wobei darauf zu achten war, dass die Gele oben und unten gut bedeckt waren. Nachdem die Taschen mit Puffer ausgespült und alle Luftblasen entfernt worden waren, konnten die Gele mit den Proben beladen werden. Es wurden 10%ige und 12,5%ige Gele im Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid 30/1 verwendet.

Zur Auftrennung der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten Form der p42 MAPK wurden 12,5%ige Gele in einem Verhältnis von Acrylamid/Bisacrylamid 100/1 verwendet. Die Sammelgele waren jeweils 6%ig.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden Hoch- und Niedrigmolekulargewichts-Marker verwendet. Für den Nachweis der MAPK-Phosphorylierung in

Methoden

MAPK-Gelen wurde ein farbmarkierter LDH-Marker eingesetzt. Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 Volt über Nacht durchgeführt.

Der Lauf wurde zumeist kurz nach dem Auslaufen der Bromphenolblau-Lauffront gestoppt. Lediglich zur Auftrennung der phosphorylierten von der nicht-phosphorylierten Form der MAPK wurde das Gel erst kurz vor Auslaufen des LDH-Markers gestoppt.

Trenngelpuffer (pH 8,8):

Tris/HCl	1,5 M
----------	-------

<u>Trenngel:</u>	<u>10,0%</u>	<u>12,5%</u>
AA/Bis AA (30/1); 30% (wt/vol)	13,6 ml	17,0 ml
Trenngelpuffer	9,5 ml	9,5 ml
Aqua bidest.	13,8 ml	9,8 ml
SDS 10% (wt/vol)	400 µl	400 µl
TEMED	30 µl	30 µl
APS 10 % (wt/vol)	400 µl	400 µl

MAPK-Trenngel 12,5%:

AA/Bis AA (100/1); 30% (wt/vol)	17,5 ml
Trenngelpuffer	10,5 ml
Aqua bidest.	14 ml
SDS 10% (wt/vol)	450 µl
TEMED	20 µl
APS 10% (wt/vol)	200 µl

Methoden

Sammelgelpuffer (pH 6,8):

Tris/HCl	0,5 M
----------	-------

Sammelgel 6%:

AA/Bis AA (30/1); 30% (wt/vol)	4 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
Aqua bidest.	10,4 ml
SDS 10% (wt/vol)	200 µl
TEMED	25 µl
APS 10% (wt/vol)	250 µl

Die Angaben beziehen sich auf die für zwei Gele benötigte Menge.

Laufpuffer:

Glycin	192 mM
Tris/HCl	24,8 mM
SDS	3,5 mM

4.6.3 Western-Blot

Die in den Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (Kyhse-Andersen 1984). Dazu wurden pro Gel neun Filterpapiere und eine Nitrocellulose-Membran in einer dem Gel entsprechenden Größe zugeschnitten.

Folgende Puffer wurden für das Westernblot-Verfahren verwendet:

Anodenpuffer I (pH 10,4):

30 mM Tris/HCl, 20% (vol/vol) Methanol

Anodenpuffer II (pH 10,4):

300 mM Tris/HCl, 20% (vol/vol) Methanol

Kathodenpuffer (pH 9,4):

25 mM Tris/HCl, 20% (vol/vol) Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure

Je drei Filterpapiere wurden mit Kathodenpuffer, Anodenpuffer I oder Anodenpuffer II getränkt. Die Nitrocellulose-Membran wurde ebenfalls in Anodenpuffer II geschwenkt. Zunächst wurden die mit Anodenpuffer I getränkten Filterpapiere luftblasenfrei auf die angefeuchtete Anode gelegt. Auf diese kamen dann die drei in Anodenpuffer II getränkten Filterpapiere zu liegen. Es folgte die Nitrocellulosemembran, auf welche das Polyacrylamidgel nach Entfernung des Sammelgels aufgelegt wurde. Die drei in Kathodenpuffer getränkten Filterpapiere und die feuchte Kathode der Blotkammer schlossen den Sandwichaufbau ab. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 90 Minuten bei Raumtemperatur.

4.6.4 Reversible Proteinfärbung mit Ponceau S

Zur Kontrolle des vollständigen Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran wurde eine reversible Färbung mit Ponceau S (Kohn und Riches 1978) durchgeführt. Dafür wurden die Membranen kurz in Ponceau S geschwenkt, wodurch die transferierten Proteine unspezifisch rot gefärbt wurden. Durch Schwenken in Aqua bidest. wurde der Membranhintergrund anschließend so weit entfärbt, dass die Proteinbanden gut sichtbar wurden und dokumentiert werden konnten. Die Färbung konnte anschließend durch Waschen in TBS-Puffer wieder vollständig entfernt werden.

1 x TBS-Puffer (pH 7,4):

Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween (vol/vol)	0,01%

4.6.5 Immunologischer Nachweis

Nach erfolgtem Proteintransfer konnten die zu untersuchenden Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Membranen zunächst 60 Minuten in 5%iger Milchpulverlösung oder 3% BSA in TBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nach einmaligem Waschen in TBS-Puffer wurden die Membranen in 20 ml des jeweiligen Erstantikörpers in der vorgeschriebenen Konzentration in 5% Milchpulver oder 3% BSA in TBS-Puffer wahlweise über Nacht bei 4°C oder für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Folgende Erstantikörper wurden verwendet:

Anti-Akt	1:1000 in 5% BSA/TBS
Anti-Akt~P	1:1000 in 5% BSA/TBS
Anti-Bad	1:1000 in 3% BSA/TBS
Anti-Bad~P Ser 112	1: 500 in 3% BSA/TBS
Anti-Caspase3	1:1000 in 5% Milchpulver/TBS
Anti-ERK2	1:2000 in 5% Milchpulver/TBS
Anti-Vinculin	1:1000 in 5% Milchpulver/TBS

Nach der Inkubation wurden die Membranen viermal für 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Um die Antigen-Antikörperbindung zu detektieren, wurden die Membranen anschließend mit den entsprechenden an Horse raddish peroxidase (HRP) gekoppelten Zweitantikörpern in 5% Milchpulver in TBS-Puffer oder in 3% BSA in TBS-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Folgende Zweitantikörper wurden verwendet:

Anti-Kanichen-IgG (HRP-gekoppelt)	1:2000
Anti-Maus-IgG (HRP-gekoppelt)	1:2000
Anti-Ziege-IgG (HRP-gekoppelt)	1:1000

Anschließend wurden die Membranen viermal für 5 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurden die Membranen kurz in ECL-

Reagenz geschwenkt, wodurch die chemilumineszierende Peroxidasereaktion in Gang gesetzt wurde. Die dadurch entstehende Chemilumineszenz konnte nun durch eine Digitalkamera aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Softwareprogramms Quantity One® quantifiziert werden.

4.7 Immuncytochemische Nachweisverfahren

Zur Analyse der Aktivierung der Caspase 3 in einzelnen Zellen wurden immuncytochemische Nachweise durchgeführt und mittels eines LSM (laser scanning microscope) aufgenommen und analysiert.

4.7.1 Gewinnung der Präparate

Die Zellen wurden auf Coverslips ausgesät und wie üblich kultiviert und behandelt (s. Kap 4.2-4.3). Anschließend wurden die Endothelzellen mit 4% (wt/vol) PFA (Paraformaldehyd) in TBS-Puffer 20 Minuten lang bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton-X100 in TBS-Puffer 8 Minuten lang permeabilisiert, um den Antikörpern den Zugang zu den Proteinen zu ermöglichen. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen für eine Stunde mit 3% BSA in TBS-Puffer geblockt.

4.7.2 Antikörperinkubation

Die Erstantikörper wurden in einer 3%igen BSA-Lösung in TBS-Puffer auf die Coverslips gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Diese Antikörperlösung wurde anderntags abgenommen, worauf drei Waschschriffe von je 10 Minuten mit TBS-Puffer folgten, um die Antikörperückstände zu entfernen.

Verwendeter Erstantikörper:

Anti-Caspase 3 aktiv

1:200 in 3% BSA/TBS

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper. Auch dieser wurde in einer 3%igen Milchpulverlösung in TBS-Puffer auf die

Coverslips aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Verwendeter Zweitantikörper:

Anti-rabbit IgG FITC-gekoppelt 1:200 in 3% BSA/TBS

Zuletzt wurde nochmals dreimal für je 10 Minuten mit PBS gewaschen.

4.7.3 Mikroskopie

Die Coverslips konnten nun mit einem Tropfen Eindeckmedium PBS/Glycerol im Verhältnis 1/1 luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgebracht und so mikroskopisch analysiert werden.

Die Präparate wurden nun an einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop analysiert. Zur Aufnahme der Bilder und zur Analyse wurde das dazugehörige Softwareprogramm LSM 510[®] verwendet.

4.8 Nachweis der DNA-Fragmentierung

Die DNA-Fragmentierung in regelmäßigen Abständen von ca. 200 Basenpaaren ist ein sicheres Kennzeichen fortschreitender Apoptose (Ellis et al. 1991). Diese Fragmentierung kann durch Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe und anschließender Ethidiumbromid-Färbung dargestellt werden.

4.8.1 Probenvorbereitung

Nachdem die Zellen wie beschrieben gewonnen, kultiviert und behandelt wurden (s. Kapitel 4.1-4.3), konnten die Zellen geerntet werden. Hierfür wurden die Zellen von drei 3,5 cm Kulturschalen mit Hilfe eines Zellschabers von den Kulturschalen abgeschabt, in einem 50 ml Falconröhrchen vereinigt und einmal mit HBSS gewaschen.

4.8.2 Präparation der genomischen DNA

Das so gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml Lysispuffer gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nachdem der Zellsuspension Proteinase K zugegeben worden war wurde sie 2 Stunden bei 55°C inkubiert.

Lysispuffer (pH 8):

NaCl	100 mM
Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
SDS (wt/vol)	1%
Proteinase K (wt/vol)	0,001%

Nach dem Lysieren der Zellen schloss sich die DNA-Extraktion in zwei Schritten an. Zunächst wurde die Suspension in Phenol/Chlorophorm (1/1) extrahiert. Dazu wurde das gleiche Volumen Phenol/Chlorophorm hinzugegeben. Die Gefäße wurden gut geschüttelt und schließlich bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere Phenolphase sowie die Interphase wurden in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Es schloss sich ein weiterer Extraktionsschritt mit Chlorophorm/Isoamylalkohol (1:13) an, welcher auf die gleiche Weise durchgeführt wurde. Wieder wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Um die so extrahierte DNA zu präzipitieren, wurde das gleiche Volumen Isopropanol hinzugegeben. Die Gefäße wurden abermals gut geschüttelt und 30 Minuten lang in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C mit 8.000 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Alkohol abgenommen und die gewonnene DNA einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, abermals abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Pellet getrocknet und anschließend bei 4°C über Nacht in TE-Puffer gelöst. Um das Pellet vollständig lösen zu können, wurde es am nächsten Morgen eine weitere Stunde geschüttelt. Daraufhin wurde die Probe mit 3 µl (4µg/ml) RNase versetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

TE-Puffer:

Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA	1 mM

4.8.3 Bestimmung des DNA-Gehalts

Im Anschluss an die Isolierung wurde die DNA-Menge quantitativ photometrisch bestimmt. Hierzu wurde 1 µl der DNA-haltigen Lösung entnommen, in 1 ml Aqua bidest. gelöst und anschließend bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen.

Für den Nachweis der DNA-Leiter wurden ca. 3 µg DNA auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

4.8.4 Gelelektrophoretischer Nachweis der DNA-Fragmentierung

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zum Gießen des Gels wurde 1 g Agarose mit 100 ml Aqua bidest. in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, so dass eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden 2 ml 50 x TAE-Puffer und 5 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Nach gutem Mischen wurde das Gel zur Polymerisation in eine Gelkammer gegossen. Nach ca. 30 Minuten war das Gel fest und konnte mit den Proben beladen werden. Zuvor wurde 5 µl TAE-Auftragspuffer zu den Proben hinzugegeben.

50 x TAE-Puffer:

Tris/HCl (pH 8)	200 mM
EDTA	5 mM

Agarose-Gel-Lösung:

Aqua bidest.	x ml
Agarose (wt/vol)	1%
Ethidiumbromid (wt/vol)	0,00005%
50x TAE-Puffer (vol/vol)	2%

TAE-Auftragspuffer:

10 x TAE Puffer	x ml
Saccharose (wt/vol)	50%
Bromphenolblau (wt/vol)	1%
Xylencyanol (wt/vol)	1%

Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 80 mA durchgeführt. Der in die DNA-Fragmente interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid konnte nun unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden.

4.9 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm der Standardabweichung (SD) aus n Experimenten unterschiedlicher Zellpräparation angegeben. Der Vergleich der Mittelwerte zwischen Gruppen wurde mit ‚One-Way Analysis of Variance‘ (ANOVA) durchgeführt, gefolgt von einem Student-Newman-Keul Post-Hoc-Test. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Gruppen wurden in homogene Gruppen a, b, c eingeordnet. Zur Datenerfassung und Datenverarbeitung wurde Microsoft Excell 2000 sowie SPSS verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Wirkung transienter Hypoxie

5.1.1 Wirkung transienter Hypoxie auf die Zellzahl

Humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurden für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt, gefolgt von einer 24-stündigen Reoxygenierung. Die Kontrollgruppe wurde für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen kultiviert. Zu Beginn der Hypoxiephase sowie am Ende der Reoxygenierung wurden die Zellzahlen bestimmt.

Serumentzug führte unter normoxen Bedingungen zu einer Reduktion der Zellzahl um 48% (von 249.000 ± 26.900 auf 130.000 ± 14.700 Zellen pro 3,5 cm Kulturschale, Abb. 5.1.A). Einen signifikant geringeren Zellverlust von 25% (188.000 ± 16.000 Zellen) zeigten Kulturen, welche für zwei Stunden einer Hypoxie ausgesetzt worden waren.

In mikrovaskulären koronaren Endothelzellen der Ratte (RCEC) sowie in makrovaskulären Aortenendothelzellen des Schweins (PAEC) wurden ganz ähnliche Wirkungen von Hypoxie auf den Zelluntergang beobachtet. In RCEC sank die Zellzahl unter Serumentzug um 44% (von 280.000 ± 12.000 auf 156.000 ± 12.500 Zellen, Abb. 5.1.B). Nach Hypoxie-Exposition wurde der Zellverlust auf 27% (202.000 ± 18.000 Zellen) reduziert. In PAEC sank die Zellzahl unter Serumentzug um $19 \pm 2\%$ (von 682.500 ± 14.600 auf 551.600 ± 19.000 Zellen Abb. 5.1.C). Dieser Zellverlust wurde durch Hypoxie-Exposition signifikant auf $6 \pm 2\%$ (642.500 ± 16.000 Zellen) reduziert.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden HUVEC für 24 Stunden mit TNF α (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Dies führte unter normoxen Kontrollbedingungen zu einem Zellverlust von 43% (von 255.000 ± 16.000 auf 142.000 ± 8.200 Zellen, Abb. 5.2). Nach Hypoxie-Exposition wurde der Verlust signifikant auf 30% (177.000 ± 8.700 Zellen) reduziert.

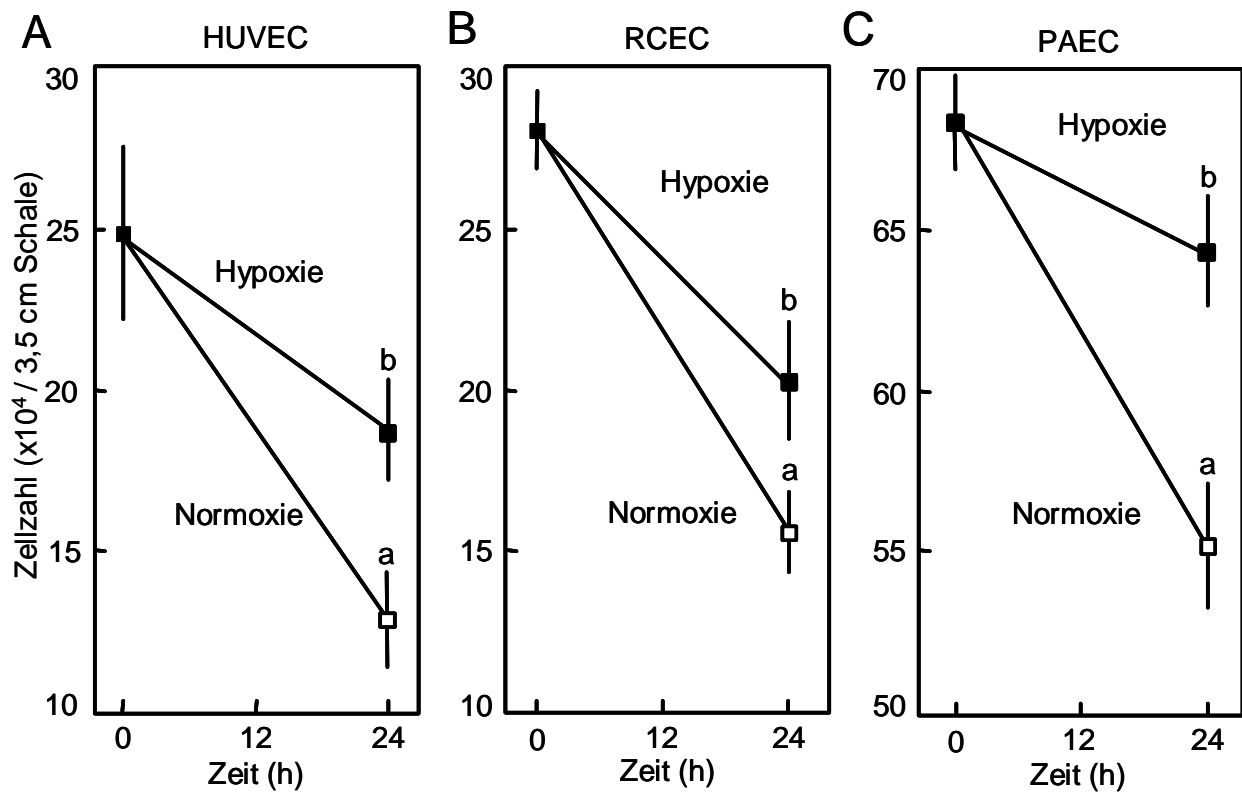


Abb. 5.1: Wirkung von Hypoxie auf den Zellverlust, induziert durch Serumentzug in kultivierten HUVEC, RCEC und PAEC

HUVEC (A), RCEC (B) oder PAEC (C) wurde für 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie ($P_{O_2} < 10$ mmHg) ausgesetzt, an die sich eine Reoxygenierung von 24 h anschloss. Die Kontrollgruppen von A, B und C wurden für den gleichen Zeitraum unter entsprechenden normoxen Bedingungen inkubiert. Dargestellt sind die Zellzahlen zu Beginn und Ende der Reoxygenierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n=9$ Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

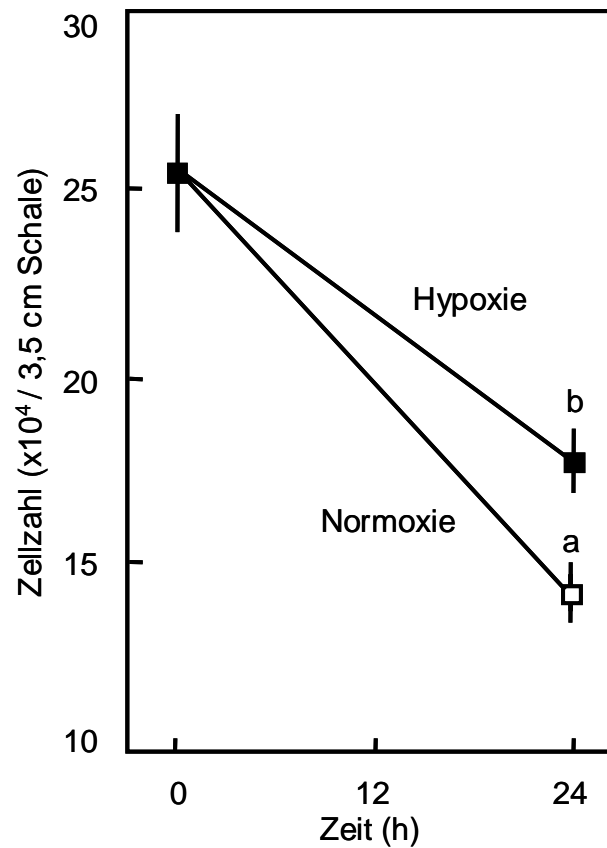


Abb. 5.2: Wirkung von Hypoxie auf den Zellverlust, induziert durch TNF α /CHX in HUVEC

HUVEC wurden für 24 h mit TNF α (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie ($P_{O_2} < 10$ mmHg) ausgesetzt, an die sich eine Reoxygenierung von 24 h anschloss. Die Kontrollgruppe wurde für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert. Dargestellt sind die Zellzahlen zu Beginn und Ende der Reoxygenierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von n=9 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

5.1.2 Wirkung transienter Hypoxie auf die Bromdesoxyuridin-Inkorporation

Grundsätzlich kann der reduzierte Zellverlust in Hypoxie-exponierten Kulturen entweder durch gesteigerte Proliferation oder durch reduzierten Zelltod verursacht werden. Daher wurde die DNA-Syntheserate mittels Analyse der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Inkorporationsrate untersucht. Hierzu wurden HUVEC für 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt, gefolgt von einer 24-stündigen Reoxygenierung. Während der Reoxygenierung wurden die Zellen für jeweils zwei Stunden in Gegenwart von BrdU inkubiert. Die BrdU-Einbaurate wurde in der FACS-Analyse bestimmt. Die BrdU-Inkorporationsrate während der ersten zwei Stunden der Reoxygenierung betrug unter normoxen Bedingungen $4 \pm 0,1\%$ und $4 \pm 0,5\%$ nach Hypoxie (Abb. 5.3). Die Inkubation von Stunde 10-12 der Reoxygenierung ergab Inkubationsraten von $3,6 \pm 0,2\%$, sowohl nach Normoxie als auch nach Hypoxie. Während der letzten zwei Stunden der 24-stündigen Reoxygenierung wurden unter normoxen Bedingungen in $2 \pm 0,2\%$ der Zellen BrdU inkorporiert und $2 \pm 0,4\%$ nach Hypoxie.

Ganz ähnlich verhielten sich die Inkorporationsraten nach einer permanenten Inkubation mit BrdU während der gesamten 24 Stunden Reoxygenierung. Dies führte zu Einbauraten von $16 \pm 1\%$ nach Normoxie und $16 \pm 2\%$ nach Hypoxie. Dies zeigt, dass sich die Einbauraten der Hypoxie-exponierten Zellen nicht signifikant von denen der normoxen Kontrollen unterscheiden.

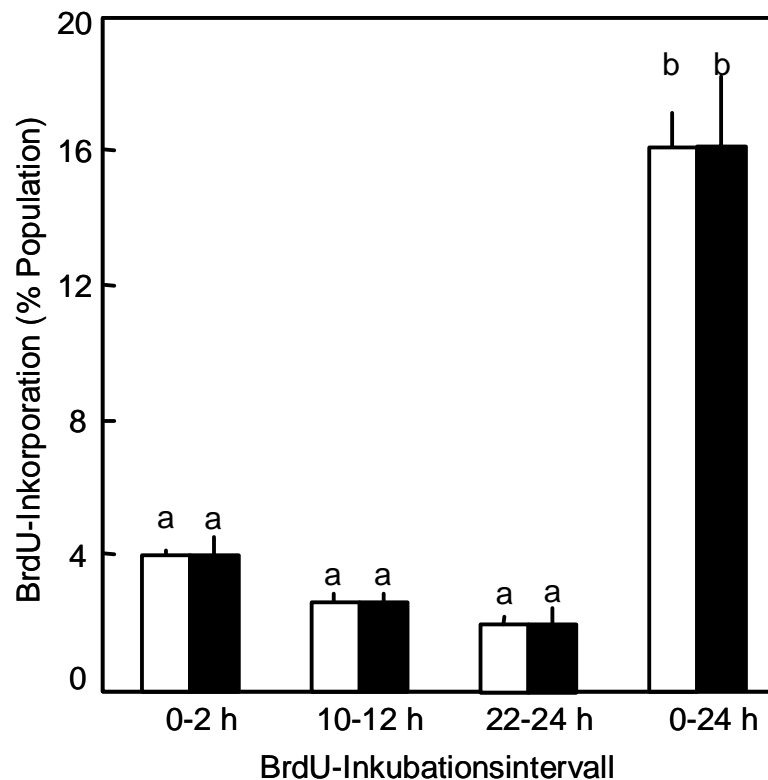


Abb. 5.3: Wirkung von Hypoxie auf die BrdU-Inkorporationsrate

HUVEC wurde 24h das Serum entzogen. Anschließend wurden die Zellen einer zweistündigen Hypoxie (■) ausgesetzt, an die sich eine Reoxygenierung von 24 h anschloss. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert (□). Während der Reoxygenierung wurden die Kulturen in Gegenwart von BrdU inkubiert. Dies wurde in einer ersten Gruppe pulsativ von Stunde 0-2, 10-12 bzw. von Stunde 22-24 durchgeführt. Eine weitere Gruppe wurde permanent während der gesamten 24 Stunden der Reoxygenierung in Gegenwart von BrdU inkubiert. Dargestellt sind die BrdU-Inkorporationsraten.

Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus $n=3$ Experimenten. Die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichneten Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander ($P<0,05$).

5.1.3 Wirkung von Serumentzug auf die DNA-Fragmentierung

Zum Nachweis des apoptotischen Zelluntergangs durch Serumentzug wurde die DNA-Fragmentierung nachgewiesen. DNA von HUVEC, welche 24- bzw. 48-stündigem Serumentzug ausgesetzt worden waren, wurde gelelektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Hierbei konnte die für Apoptose typische Fragmentierung der DNA in 180 Basenpaare und deren Vielfaches (Ellis et al. 1991) gefunden werden (Abb. 5.4). Als Positivkontrolle dienten mit UV-Licht bestrahlte Zellkulturen. Als Negativkontrolle dienten Zellkulturen, welche keinem Serumentzug ausgesetzt worden waren.

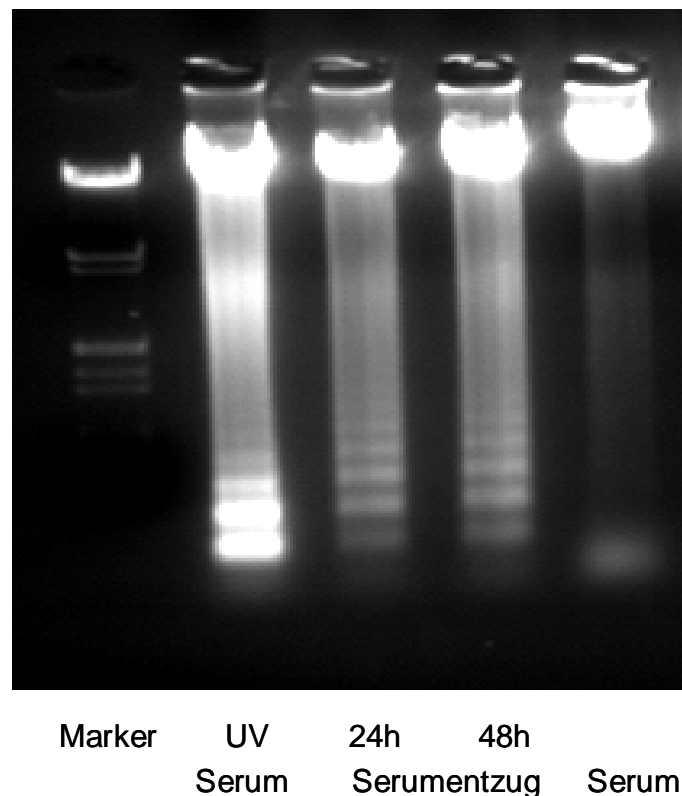


Abb. 5.4: Wirkung von Serumentzug auf die DNA-Fragmentierung
HUVEC wurde 24 und 48 Stunden das Serum entzogen. Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel, welches die DNA-Fragmentierung verschiedener HUVEC-Kulturen nach einem 24- bzw. 48-stündigem Serumentzug zeigt. Als Positivkontrolle dienten HUVEC, welche mit ultraviolett (UV) Licht bestrahlt wurden, als Negativkontrolle dienten unbehandelte HUVEC.

5.1.4 Wirkung von Hypoxie auf die Apoptoserate

Zur Differenzierung der Anteile apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen der Zellkulturen wurden Doppelfärbungen mit Annexin V und Propidiumiodid durchgeführt und die Zellen anschließend mittels FACS analysiert. HUVEC wurden zunächst 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie und daraufhin einer 24-stündigen Reoxygenierungsphase ausgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde für die gleichen Zeiträume unter normoxen Bedingungen kultiviert. Serumentzug führte unter normoxen Bedingungen zu einem Anteil apoptotischer Zellen von $36 \pm 4\%$. Der Anteil vitaler Zellen betrug $48 \pm 5\%$, der Anteil nekrotischer Zellen $15 \pm 4\%$ (Abb. 5.5.A). In Hypoxie-exponierten Kulturen wurde eine signifikant geringere Apoptoserate von $26 \pm 6\%$ gefunden. Gleichzeitig war der Anteil vitaler Zellen signifikant auf $61 \pm 7\%$ gesteigert. Die Rate nekrotischer Zellen betrug $12 \pm 3\%$.

Eine ganz ähnliche Wirkung von Hypoxie auf die Apoptoserate konnte in RCEC und PAEC beobachtet werden. In RCEC führte Serumentzug zu einer Apoptoserate von $26 \pm 3\%$, der Anteil vitaler Zellen betrug $61 \pm 4\%$ und der nekrotischer Zellen $13 \pm 1\%$ (Abb. 5.5.B). In Hypoxie-exponierten Kulturen war die Apoptoserate auf $19 \pm 1\%$ reduziert und der Anteil vitaler Zellen auf $70 \pm 2\%$ erhöht. Die Nekroserate betrug $8 \pm 0,6\%$. In PAEC führte Serumentzug zu einer Apoptoserate von $22 \pm 3\%$. Der Anteil vitaler Zellen betrug $70 \pm 4\%$, der Anteil nekrotischer Zellen $8 \pm 2\%$ (Abb. 5.5.C). Hypoxie führte zu einer Reduktion der Apoptoserate auf $15 \pm 3\%$ und gleichzeitig zu einem erhöhten Anteil vitaler Zellen von $77 \pm 2\%$. Die Nekroserate betrug $8 \pm 1\%$.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden HUVEC 24 Stunden mit TNF α /CHX behandelt, bevor sie einer zweistündigen Hypoxie mit anschließender 24-stündiger Reoxygenierungsphase ausgesetzt wurden. Die Kontrollgruppen wurden für die gleichen Zeiträume unter normoxen Bedingungen kultiviert. Behandlung mit TNF α /CHX führte unter normoxen Bedingungen zu einer Apoptoserate von $28 \pm 2\%$ (Abb. 5.6). Der Anteil vitaler Zellen betrug $50 \pm 4\%$ und derjenige nekrotischer Zellen $22 \pm 2\%$. In Hypoxie-exponierten Kulturen wurde die Apoptoserate signifikant auf $22 \pm 2\%$ gesenkt. Dabei stieg der Anteil vitaler Zellen auf $57 \pm 1\%$ an, während die Nekroserate mit $21 \pm 2\%$ nahezu unverändert blieb.

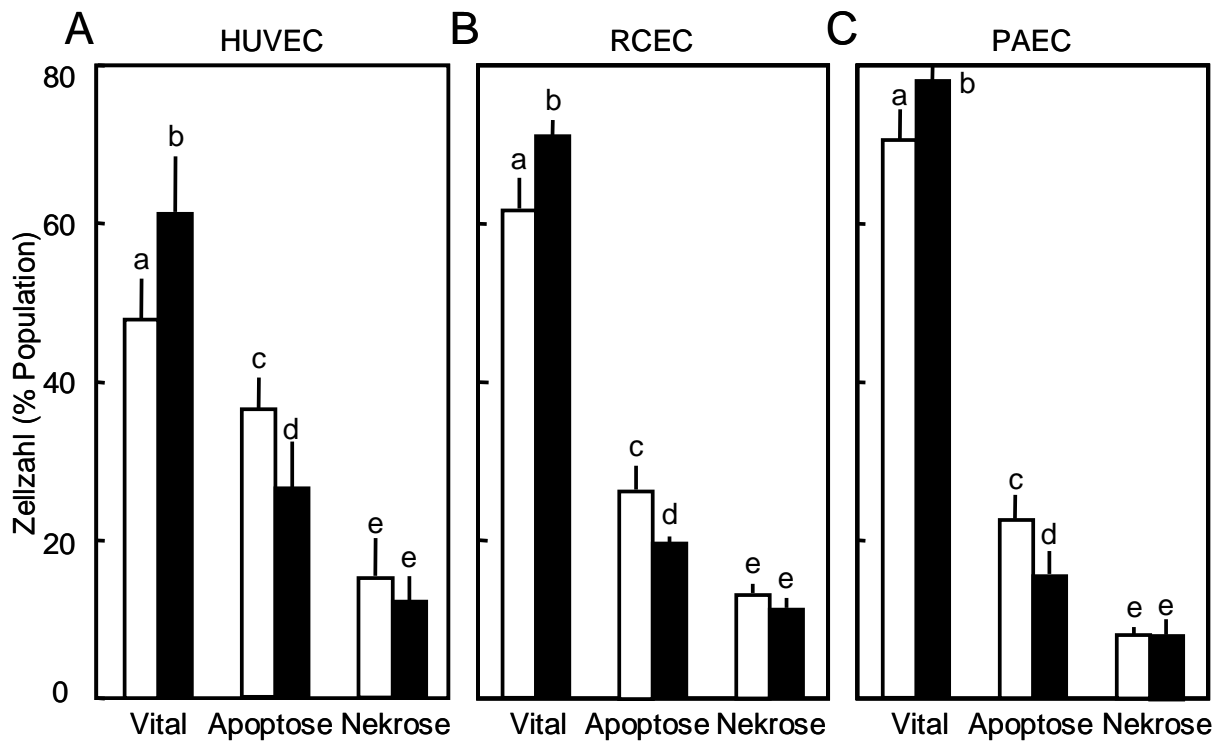


Abb. 5.5: Wirkung von Hypoxie auf die Apoptoserate in HUVEC, PAEC und RCEC, induziert durch Serumentzug

HUVEC **(A)**, RCEC **(B)** und PAEC **(C)** wurde 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie (■) ausgesetzt, an die sich eine Reoxygenierung von 24 h anschloss. Die Kontrollgruppen von A, B und C (□) wurden für den gleichen Zeitraum unter entsprechenden normoxen Bedingungen inkubiert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen nach 24 h Reoxygenierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n=9$ Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P<0,05$).

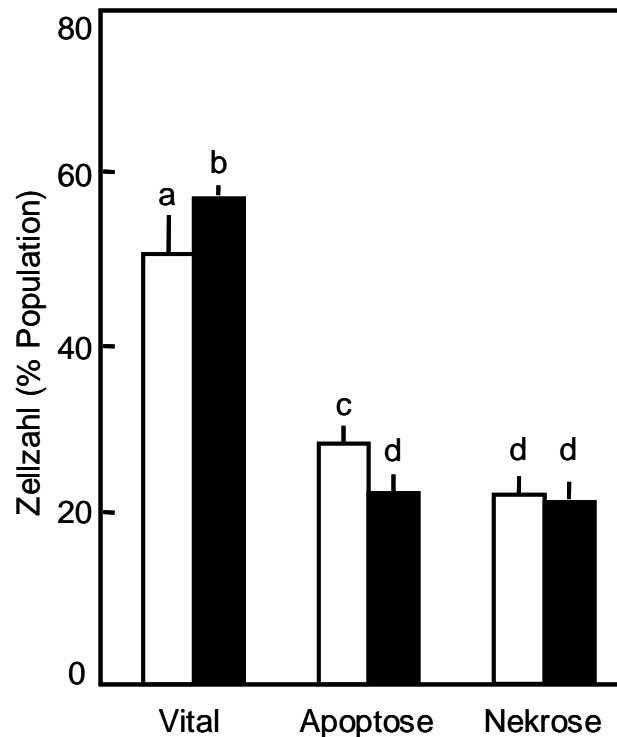


Abb. 5.6: Wirkung von Hypoxie auf die Apoptoserate in HUVEC, induziert durch TNF α /CHX

HUVEC wurden für 24 h mit TNF α (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie (■) ausgesetzt, an die sich eine Reoxygenierung von 24 h anschloss. Die Kontrollgruppen (□) wurden für den gleichen Zeitraum unter entsprechenden normoxen Bedingungen inkubiert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen einer Population nach 24 h Reoxygenierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von n=9 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05).

5.2 Die Rolle der ERK2

5.2.1 Wirkung von Hypoxie auf die Phosphorylierung der ERK2

Die Aktivierung der ERK2 wurde mittels Western-Blot bestimmt. Das hier verwendete Verfahren erlaubte die gelelektrophoretische Trennung der nicht-phosphorylierten von der phosphorylierten ERK-Form. Zur Detektion der ERK2 wurde ein Antikörper verwendet, welcher sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte ERK2 erkennt. Der prozentuale Phosphorylierungsgrad wurde aus dem Verhältnis der Intensitäten der Banden des phosphorylierten Proteins zum Gesamtprotein densitometrisch bestimmt. Die Zellen wurden für 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Zu Beginn der Hypoxiephase betrug die ERK-Phosphorylierung $25 \pm 2\%$ (Abb. 5.7). Transiente Hypoxie führte nach 10 Minuten zu einer Zunahme der Phosphorylierung auf $44 \pm 5\%$. Nach 30 Minuten Hypoxie war die Phosphorylierungsrate bereits wieder auf $23 \pm 2\%$ gesunken. Unter Normoxie konnte keine signifikante Änderung der Phosphorylierungsrate festgestellt werden. Die Hemmung von MEK durch PD 98059 (20 $\mu\text{mol/l}$) verhinderte die ERK2-Phosphorylierung vollständig (Abb. 5.8). In einem anderen experimentellen Ansatz wurden die Zellen für 24 Stunden mit TNF α /CHX inkubiert, bevor sie einer Hypoxie ausgesetzt wurden. Zu Beginn der Hypoxie betrug die ERK-Phosphorylierung hier $17 \pm 7\%$. Transiente Hypoxie führte nach 10 Minuten zu einer Phosphorylierung von $36 \pm 3\%$. Nach 30 Minuten war die Phosphorylierung wieder auf $21 \pm 6\%$ abgesunken (Abb. 5.9.A). Unter normoxen Bedingungen wurde keine signifikante Änderung der Phosphorylierungsrate festgestellt. Auch in diesem experimentellen Ansatz verhindert eine Hemmung der MEK (PD 98059) die ERK2-Aktivierung vollständig (Abb. 5.9.B).

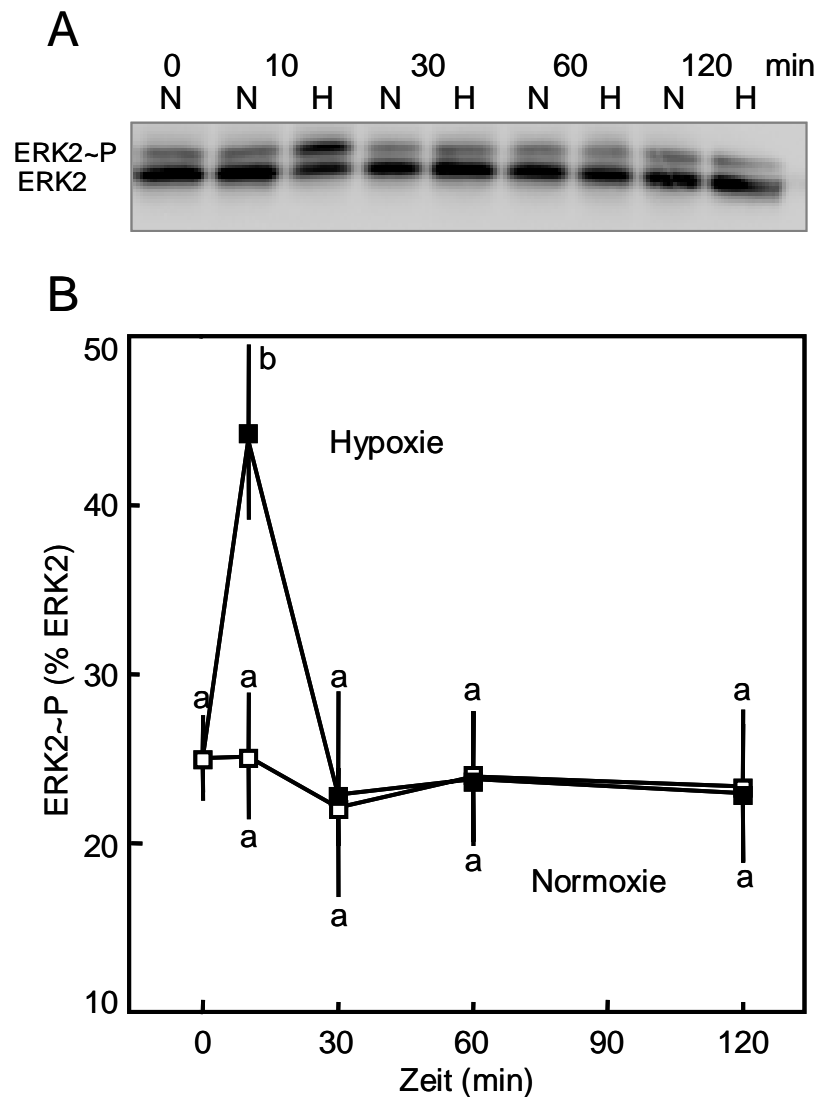


Abb. 5.7: Wirkung von Hypoxie auf die Phosphorylierung von ERK2 in kultivierten HUVEC

HUVEC wurde für 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den entsprechenden Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die Auftrennung der phosphorylierten (ERK2~P) und nicht phosphorylierten (ERK2) Form der ERK2 nach 0, 10, 30, 60 und 120 Minuten unter Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) zeigt.

(B) Densitometrische Western-Blot-Auswertung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der ERK2-Phosphorylierung an Gesamt-ERK2. Angegeben sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

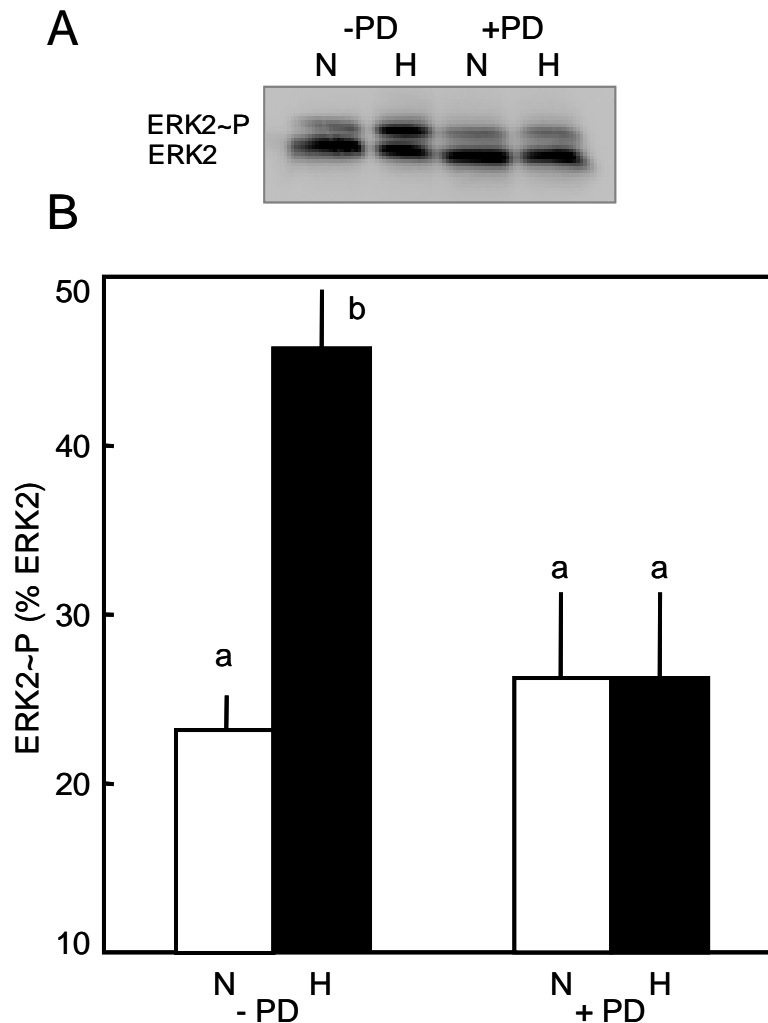


Abb. 5.8: Wirkung des MEK-Inhibitors PD 98059 auf die Hypoxie-induzierte Phosphorylierung von ERK2 in kultivierten HUVEC

HUVEC wurde 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Eine weitere Gruppe wurde unter Hemmung der MEK durch PD 98059 (20 μ M) einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die Auftrennung der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form der ERK2 nach 10 Min. unter Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) ohne (-PD) und mit (+PD) Hemmung von MEK zeigt.

(B) Densitometrische Western-Blot-Auswertung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der ERK2-Phosphorylierung an Gesamt-ERK2. Angegeben sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

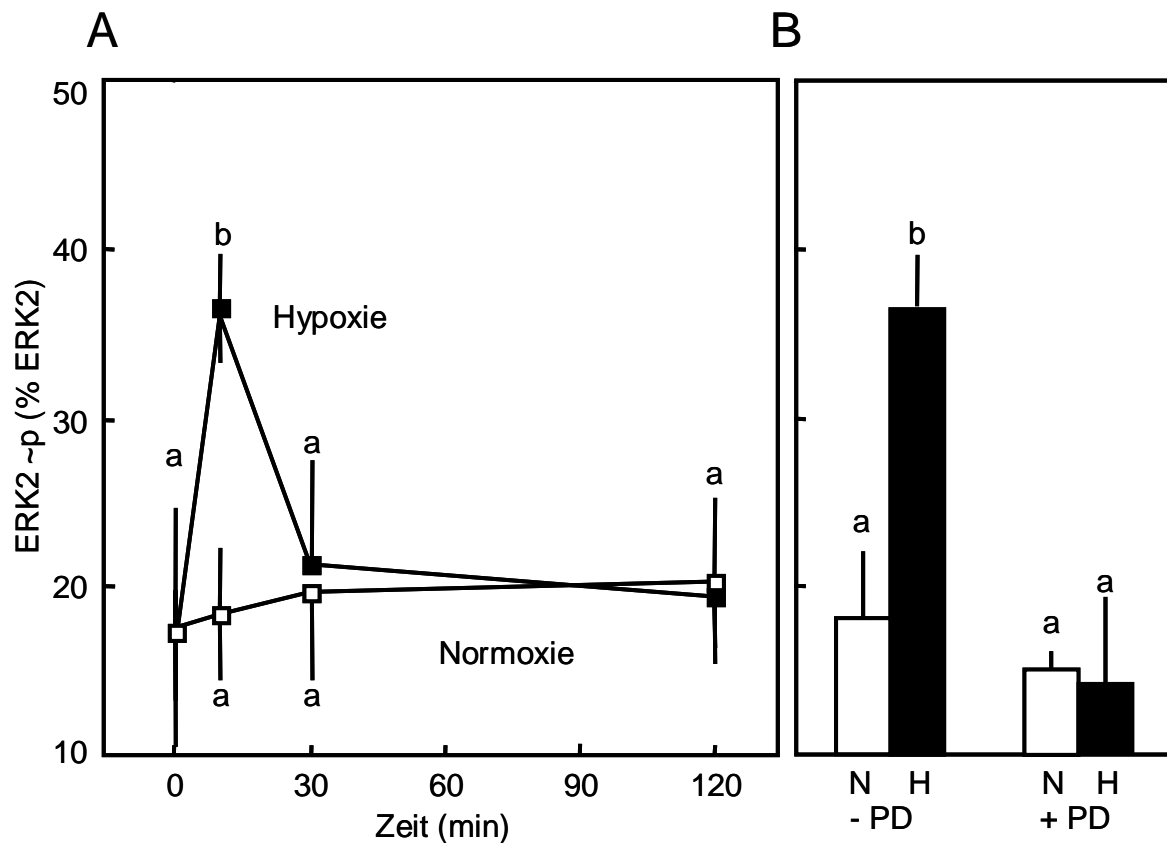


Abb. 5.9: Wirkung von Hypoxie auf die ERK2-Phosphorylierung in kultivierten HUVEC

HUVEC wurden 24 h mit TNF α (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Eine weitere Gruppe wurde in Gegenwart des MEK-Inhibitors PD 98059 (20 μ M) einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter entsprechenden normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Densitometrische Auswertung des Western-Blots. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der ERK2-Phosphorylierung, bezogen auf Gesamt-ERK2, nach 0, 10, 30 und 120 Minuten unter Hypoxie bzw. Normoxie.

(B) Densitometrische Auswertung des Western-Blots. Dargestellt ist die prozentuale ERK2-Phosphorylierung nach 10 Minuten unter Hypoxie bzw. Normoxie in Abwesenheit (-PD) und Gegenwart (+PD) des MEK-Inhibitors PD 98059. Angegeben sind die Mittelwerte aus n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

5.2.2 Rolle der ERK für den Hypoxie-Effekt

5.2.2.1 Rolle der ERK für den hypoxischen Zellzahl-Effekt

Die Rolle der ERK-Aktivierung wurde zum einen durch pharmakologische Hemmung von MEK mit PD 98059 und zum anderen durch AS-Strategie gegen ERK1/2 untersucht. HUVEC wurden für 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt, gefolgt von einer 24-stündigen Reoxygenierung. Die Kontrollgruppe wurde für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen kultiviert. Am Ende der Reoxygenierung wurde die Zellzahl bestimmt. Diese betrug unter normoxen Bedingungen 117.000 ± 10.000 (Abb. 5.10). In Hypoxie-exponierten Kulturen betrug die Zellzahl 169.000 ± 10.000 . Nach Hemmung der MEK durch PD 98059 während der Hypoxiephase betrug die Zellzahl auch nach Hypoxie nur noch 116.000 ± 8.000 . Unter normoxen Bedingungen betrug die Zellzahl auch nach Zugabe von PD 98059 unverändert 117.000 ± 9000 Zellen. Nach der spezifischeren Hemmung der ERK2 durch Antisense-Oligonukleotide betrug die Zellzahl 127.000 ± 5.000 nach Hypoxie und 123.000 ± 7.000 nach Normoxie. Zur Kontrolle der gelungenen Transfektion wurden Nonsense-Oligonukleotide eingesetzt. Hier betrug die Zellzahl unter normoxer Kontrolle 123.000 ± 6.000 , dahingegen wurde nach Hypoxie-Exposition eine Zellzahl von 169.000 ± 10.000 bestimmt.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden die Zellen für 24 Stunden mit TNF α /CHX inkubiert bevor sie einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt wurden, an die sich eine 24-stündige Reoxygenierungsphase anschloss. Die Kontrollgruppe wurde für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen kultiviert. Am Ende der Reoxygenierung betrug die Zellzahl unter normoxen Bedingungen 142.000 ± 9.000 und nach Hypoxie-Exposition 180.000 ± 10.000 . Nach Hemmung der MEK durch PD 98059 betrug die Zellzahl der normoxen Kontrolle 137.000 ± 9.000 und nach Hypoxie 140.000 ± 9.000 . Die spezifischere Hemmung der ERK2 durch Antisense-Oligonukleotide verhinderte auch in diesem experimentellen Ansatz den Hypoxie-Effekt. In den normoxen Kontrollen wurden 138.000 ± 9.000 Zellen und nach Hypoxie-Exposition 137.000 ± 9.000 Zellen gezählt. Auch in diesem Ansatz wurden zur Kontrolle der Transfektion Nonsense-Oligonukleotide eingesetzt. Unter normoxen Bedingungen betrug die Zellzahl 140.000 ± 10.000 , dahingegen wurde nach Hypoxie-Exposition eine Zellzahl von 177.000 ± 9.000 festgestellt.

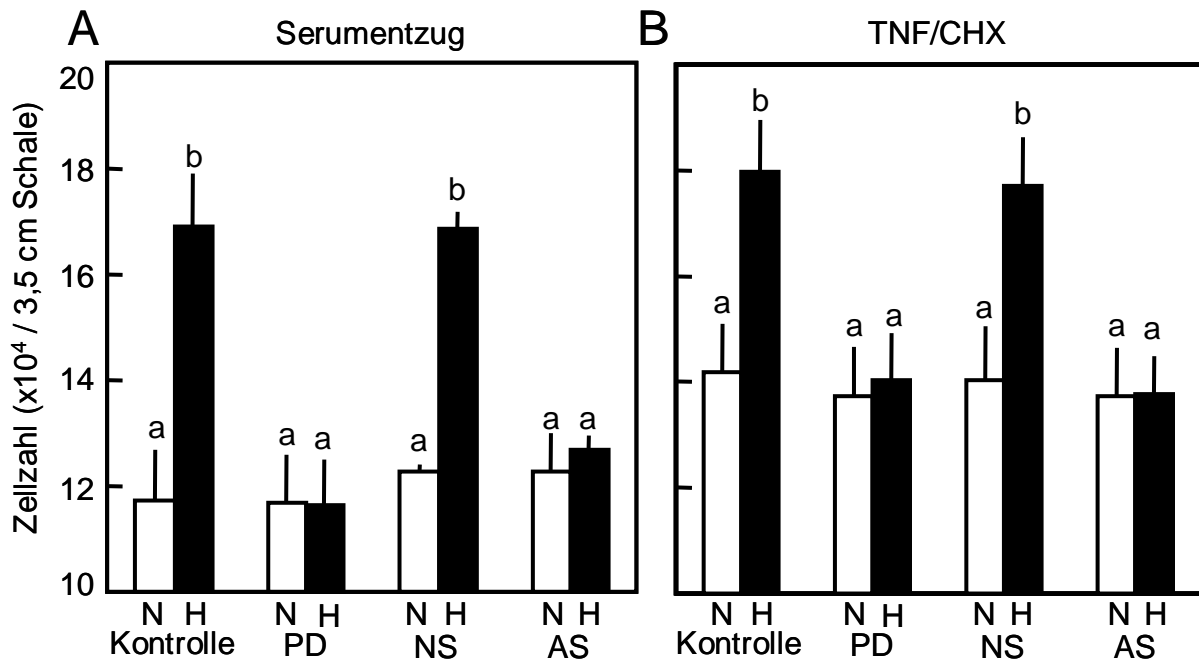


Abb. 5.10: Wirkung des MEK-Inhibitors PD 98059 und ERK1/2 Antisense auf den Hypoxie-Effekt in HUVEC-Kulturen

HUVEC wurde **(A)** für 24 h das Serum entzogen bzw. **(B)** 24 h in Gegenwart von TNF α (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie (■) ausgesetzt. Dabei wurde ein Teil der Gruppe unter MEK-Hemmung durch PD 98059 (20 μ M) bzw. nach Vorbehandlung der Zellen mit Antisense (AS)-Oligonukleotiden (10 μ g/ml) gegen ERK 1/2 einer Hypoxie ausgesetzt. Der andere Teil der Gruppe wurde keiner MEK-Hemmung unterzogen und entweder unbehandelt (Kontrolle) oder nach Vorbehandlung mit Nonsense (NS)-Oligonukleotiden einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden unter entsprechenden normoxen Bedingungen (□) inkubiert. Dargestellt ist die Zellzahl nach 24 Stunden Reoxygenierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus n=9 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (P<0,05).

5.2.2.2 Einfluss von ERK2 auf die Apoptose

Um den Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf den apoptotischen Zelluntergang zu analysieren, wurden HUVEC 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Eine Gruppe wurde einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt und anschließend 24 Stunden reoxygeniert. Die Kontrollgruppe wurde für die gleichen Zeiträume unter normoxen Bedingungen inkubiert. Am Ende der Reoxygenierungsphase wurden die Anteile apoptotischer, vitaler und nekrotischer Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

In der normoxen Kontrollgruppe betrug die Apoptoserate $45 \pm 5\%$ und der Anteil vitaler Zellen $45 \pm 6\%$ (Abb.5.11. I.A+B). In Hypoxie-exponierten Kulturen war die Apoptose auf $35 \pm 3\%$ gesenkt und der Anteil vitaler Zellen auf $57 \pm 3\%$ gesteigert. Dieser Effekt konnte in Populationen, welche mit AS-Oligonukleotiden gegen ERK2 behandelt worden waren, nicht erzielt werden. Nach Normoxie betrug die Apoptoserate $46 \pm 3\%$ und die Rate vitaler Zellen $42 \pm 6\%$. In Hypoxie-exponierten Kulturen betrug die Apoptoserate $45 \pm 2\%$ und der Anteil vitaler Zellen $45 \pm 3\%$.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden HUVEC 24 Stunden mit TNF α /CHX inkubiert, bevor sie einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt wurden. Anschließend wurden sie 24 Stunden reoxygeniert. Am Ende der Reoxygenierungsphase wurden die Anteile apoptotischer, vitaler und nekrotischer Zellen bestimmt. In den normoxen Kontrollen betrug die Apoptoserate $38 \pm 4\%$ und der Anteil vitaler Zellen $49 \pm 3\%$ (Abb.5.11. II A+B).. In den Hypoxie-exponierten Kulturen war die Apoptoserate auf $34 \pm 2\%$ reduziert und der Anteil vitaler Zellen auf $58 \pm 3\%$ erhöht. Dieser Hypoxie-Effekt wurde auch in diesen Experimenten durch die Hemmung von ERK2 durch AS-Oligonukleotide unterdrückt. Hier betrug nach Normoxie die Apoptoserate $41 \pm 3\%$ und der Anteil vitaler Zellen $47 \pm 3\%$. Die Hypoxie-exponierten Kulturen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Apoptoserate lag bei $41 \pm 3\%$ und der Anteil vitaler Zellen bei $47 \pm 3\%$.

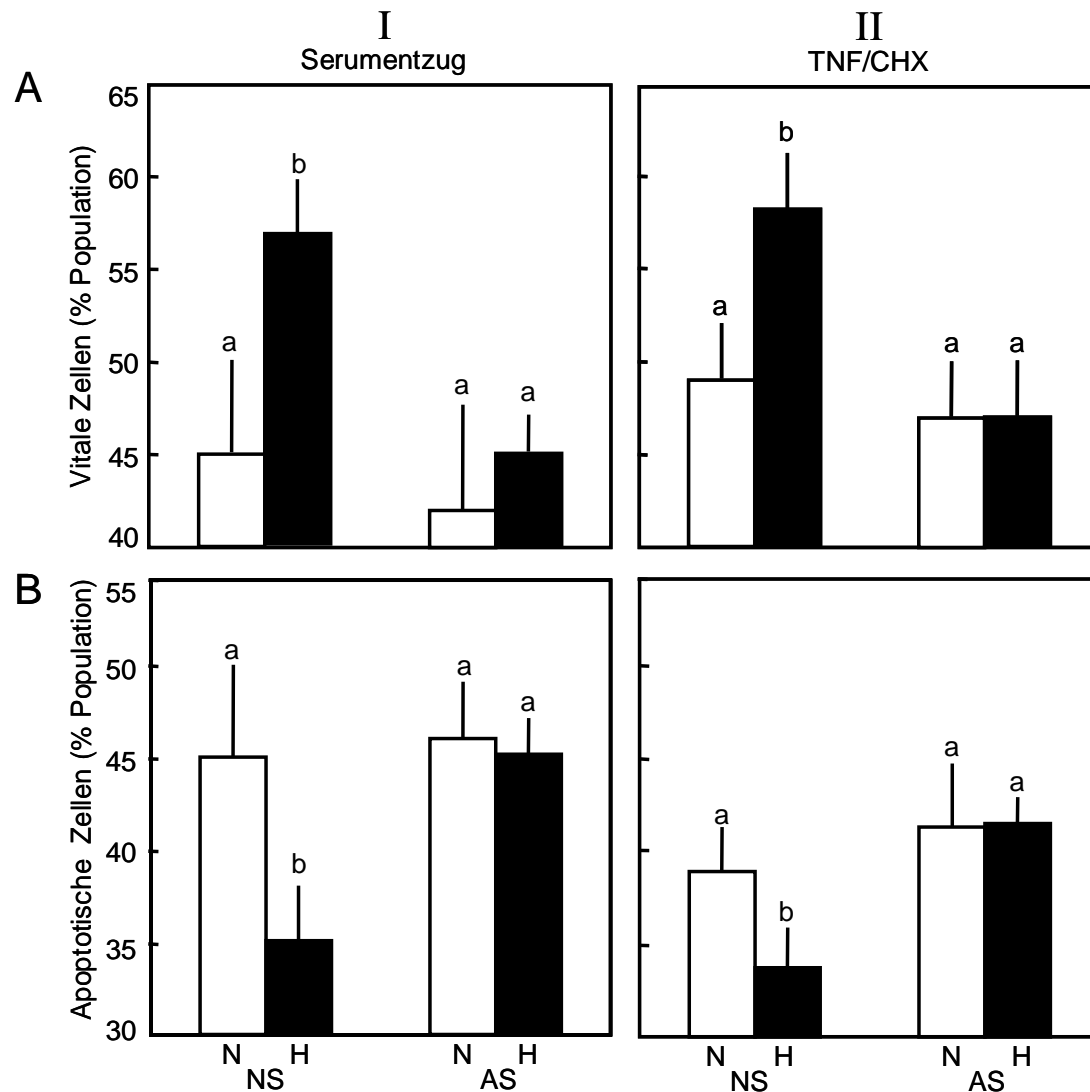


Abb. 5.11: Einfluss von ERK-Hemmung auf den anti-apoptotischen Effekt transients Hypoxie

HUVEC wurde (I) für 24 h das Serum entzogen oder (II) für 24 h in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Die Zellen wurden nach Vorbehandlung entweder mit Nonsense-Oligonukleotiden (NS) oder mit ERK1/2 Antisense-Oligonukleotiden (AS) einer zweistündigen Hypoxie (■) ausgesetzt, an die sich eine Reoxygenierung von 24 h anschloss. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter entsprechenden normoxen Bedingungen (□) inkubiert. Dargestellt sind die prozentualen Anteile vitaler (A) und apoptotischer (B) Zellen der Populationen nach 24 Stunden Reoxygenierung. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD aus $n=9$ Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P<0,05$).

5.3 Die Rolle des Bcl-2 Familienmitglieds Bad

5.3.1 Rolle des MEK/ERK-Signalweges für die Bad-Phosphorylierung

Um den Einfluss des MEK/ERK-Signalweges auf Bad als mögliches Target zu untersuchen, wurde die Phosphorylierungsrate von Bad mittels Western-Blot-Verfahren ermittelt. Dafür wurde auf derselben Membran zunächst die an der Phosphorylierungsstelle Serin 112 phosphorylierte Form von Bad (Bad~P) und anschließend als Ladungskontrolle das gesamte Bad detektiert und daraus der Quotient gebildet. Der Quotient aus der phosphorylierten Form von Bad und dem gesamten Bad nach 24 Stunden Serumentzug wurde auf 100 % gesetzt.

HUVEC wurden 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Transiente Hypoxie führte nach 30 Minuten zu einer Zunahme der Bad-Phosphorylierung auf $162 \pm 8\%$ (Abb. 5.12). Nach 60 Minuten Hypoxie war die Phosphorylierungsrate bereits wieder auf $90 \pm 17\%$ gesunken. Unter Normoxie konnte hingegen keine signifikante Steigerung der Phosphorylierung festgestellt werden. Die Hemmung von MEK durch PD 98059 hob die Bad-Phosphorylierung vollständig auf (Abb. 5.13). In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden HUVEC für 24 Stunden mit TNF α /CHX inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Die Bad-Phosphorylierung zu Beginn der Hypoxiephase wurde auf 100% gesetzt. Transiente Hypoxie führte nach 30 Minuten zu einer Zunahme der Phosphorylierung auf $156 \pm 12\%$. Nach 60 Minuten war die Phosphorylierungsrate bereits auf $80 \pm 21\%$ gesunken. Unter Normoxie konnte keine signifikante Änderung der Phosphorylierungsrate festgestellt werden (Abb. 5.14). Die Hemmung von MEK mit PD 98059 führte zu einer vollständigen Hemmung der Bad-Phosphorylierung.

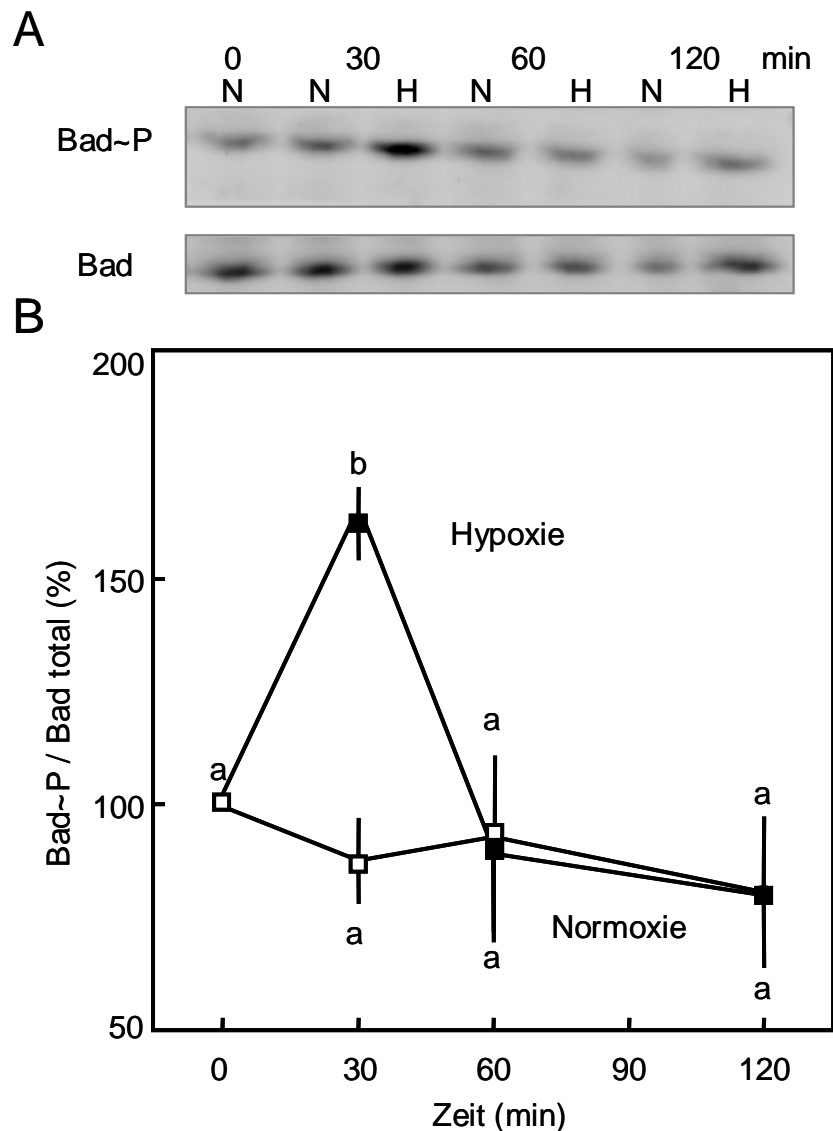


Abb. 5.12: Wirkung von Hypoxie auf die Bad-Phosphorylierung in kultivierten HUVEC

HUVEC wurde für 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die phosphorylierte Form von Bad (Bad~P) sowie das gesamte Bad nach 0, 10, 30, 60 und 120 Min unter Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) zeigt.

(B) Densitometrische Western-Blot-Auswertung. Dargestellt ist die Bad-Phosphorylierung nach 0, 30, 60 und 120 Minuten Hypoxie bzw. Normoxie. Angegeben sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

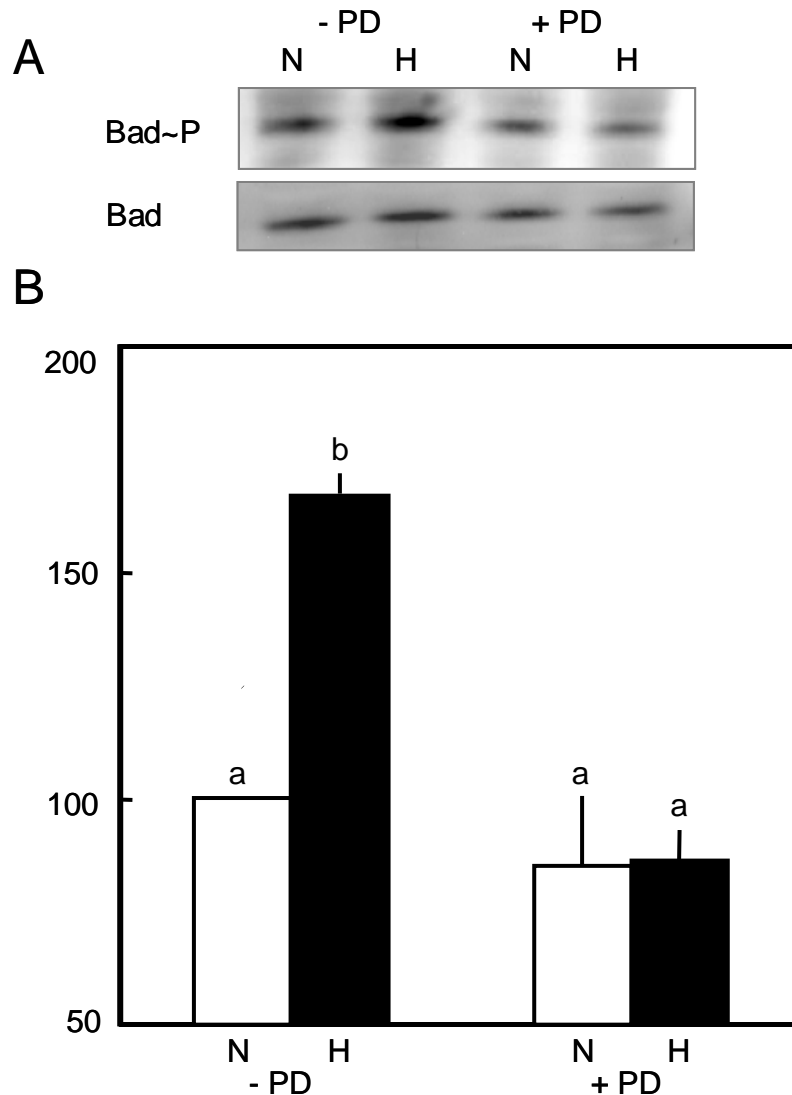


Abb.5.13: Wirkung des MEK-Inhibitors 98059 auf die Hypoxie-induzierte Bad-Phosphorylierung in kultivierten HUVEC

HUVEC wurde 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Eine weitere Gruppe wurde in Gegenwart des MEK-Inhibitors PD 98059 (20 μ M) einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter vergleichbaren normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die phosphorylierte Form von Bad sowie das gesamte Bad nach 30 Minuten Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) in Abwesenheit (-PD) und Gegenwart (+PD) des MEK-Inhibitors PD 98059 darstellt.

(B) Densitometrische Auswertung der Bad-Phosphorylierung nach 30 Minuten Hypoxie bzw. Normoxie in Abwesenheit (-PD) und Gegenwart (+PD) des MEK-Inhibitors PD 98059.

Angegeben sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

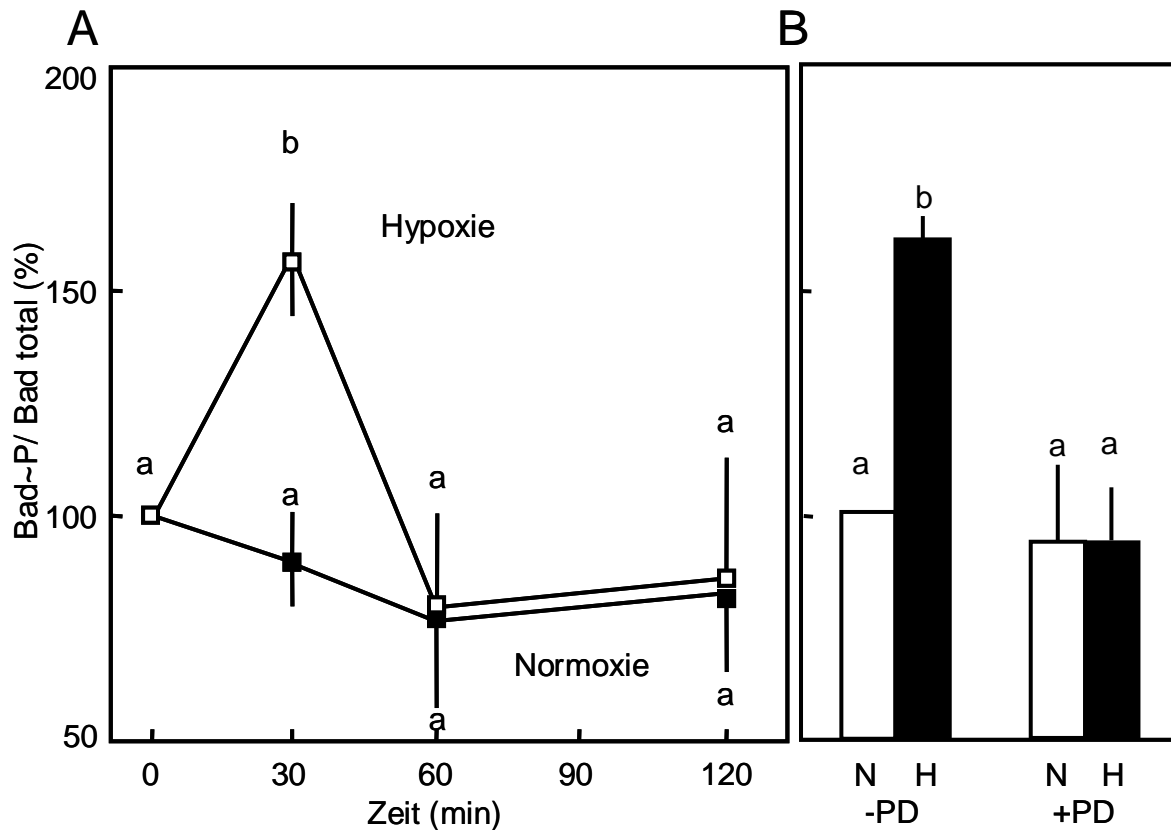


Abb. 5.14: Wirkung von Hypoxie auf die Bad-Phosphorylierung in kultivierten HUVEC

HUVEC wurden 24 h in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Eine weitere Gruppe wurde in Gegenwart des MEK-Inhibitors PD 98059 (20 μM) einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Densitometrische Auswertung der Western-Blots. Dargestellt ist die Bad-Phosphorylierung nach 0, 30, 60 und 120 Minuten Hypoxie bzw. Normoxie.

(B) Densitometrische Auswertung der Bad-Phosphorylierung nach 30 Minuten Hypoxie bzw. Normoxie in Abwesenheit (-PD) und Gegenwart (+PD) des MEK-Inhibitors PD 98059. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=3$ Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P<0,05$).

5.3.2 Die Rolle des PI3-Kinase/Akt-Signalweges bei der Bad-Phosphorylierung

Um die Rolle des PI3-Kinase/Akt-Signalweges in der Hypoxie als möglichen Aktivator der Bad-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von Akt mittels Western-Blot-Verfahren ermittelt. Dafür wurde auf derselben Membran zunächst die phosphorylierte Form von Akt (Ser 473) und anschließend das gesamte Akt detektiert. HUVEC wurden 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Nach 24 Stunden Serumentzug war die Akt-Phosphorylierung nahezu vollständig herabreguliert. Unter Hypoxie konnte keine signifikante Änderung der Phosphorylierung festgestellt werden (Abb. 5.15). In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden HUVEC 24 Stunden mit $\text{TNF}\alpha$ plus CHX inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Die Phosphorylierungsrate von Akt wurde durch Inkubation mit $\text{TNF}\alpha$ plus Cycloheximid nicht beeinflusst. Unter Hypoxie konnte auch in diesem Modell keine Änderung der Akt-Phosphorylierung gefunden werden.



Abb. 5.15: Einfluss von Hypoxie auf die Akt-Phosphorylierung in kultivierten HUVEC

HUVEC wurde entweder 24 h das Serum entzogen oder 24 h in Gegenwart von $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

Dargestellt sind repräsentative Western-Blots, welche die phosphorylierte Form von Akt an der Phosphorylierungsstelle Serin 473, sowie das gesamte Akt nach 0, 30, 60 und 120 Minuten Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) zeigen. Als Kontrolle (K) diente eine unbehandelte Zellpopulation.

5.4 Wirkung von Hypoxie auf die Caspase 3-Spaltung

Um den Einfluss von Hypoxie auf die Caspasespaltung als Element der Endstrecke des apoptotischen Signalweges zu untersuchen, wurde die Spaltung der Caspase 3 zum einen durch ein immuncytochemisches Verfahren und zum anderen durch Western-Blot-Analyse bestimmt.

5.4.1 Immuncytochemische Analyse

Für den Nachweis der Caspase 3-Aktivierung wurden HUVEC für 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Die Spaltung von Caspase 3 wurde mittels eines spezifischen Antikörpers gegen die aktiven, 18 kDa großen Spaltprodukte der Caspase analysiert. Nach 24 stündigem Serumentzug unter normoxen Bedingungen war die Caspasespaltung deutlich aktiviert. (Abb. 5.16.A) Durch die Behandlung mit zweistündiger Hypoxie konnte die Anzahl positiver Zellen deutlich gesenkt werden. (Abb. 5.16.B)

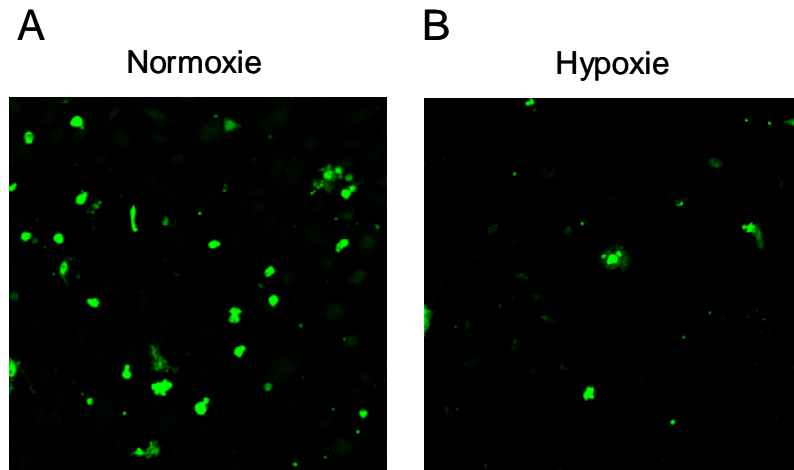


Abb. 5.16: Wirkung von Hypoxie auf die Caspasespaltung in HUVEC
HUVEC wurde 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppe wurde für die gleiche Zeit unter normoxen Bedingungen inkubiert. Dargestellt sind repräsentative immuncytochemische Bilder gegen das aktive Spaltprodukt der Caspase 3 in HUVEC nach 24 Stunden Serumentzug **(A)** unter normoxen Bedingungen und **(B)** nach zweistündiger Hypoxie-Exposition.

5.4.2 Gelelektrophoretische Analyse

Zur quantitativen Bestimmung und zur Untersuchung des Zeitverlaufes wurde die Spaltung der Caspase 3 mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Dafür wurden auf derselben Membran zum einen mittels eines Antikörpers die 18 und 16 kDa großen Spaltprodukte und zum anderen als Ladungskontrolle das Gerüstprotein Vinculin detektiert und daraus der Quotient gebildet. HUVEC wurden 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. 24-stündiger Serumentzug führte zu einem deutlichen Anstieg der Caspase 3-Spaltung (Abb. 5.17). Während der zweistündigen Hypoxie wurde die Caspasespaltung nach 60 Minuten um $40 \pm 10\%$ reduziert (Abb. 5.18). In den normoxen Kontrollen konnte keine signifikante Änderung der Caspase 3-Spaltung festgestellt werden. Durch MEK-Hemmung ($20 \mu\text{M}$ PD 98059) wurde dieser Effekt vollständig unterdrückt. Dies führte unter Normoxie zu einer Steigerung der Caspasespaltung auf $148 \pm 16\%$ sowie unter Hypoxie auf $160 \pm 7\%$ (Abb. 5.19). In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden HUVEC mit $\text{TNF}\alpha$ plus CHX inkubiert und anschließend einer Hypoxie ausgesetzt. Dies führte gegenüber den normoxen Kontrollen zu einer signifikanten Reduktion der Caspasespaltung von $45 \pm 7\%$. Dieser Effekt wurde auch hier durch den MEK-Inhibitor PD 98059 vollständig aufgehoben (Abb. 5.20).

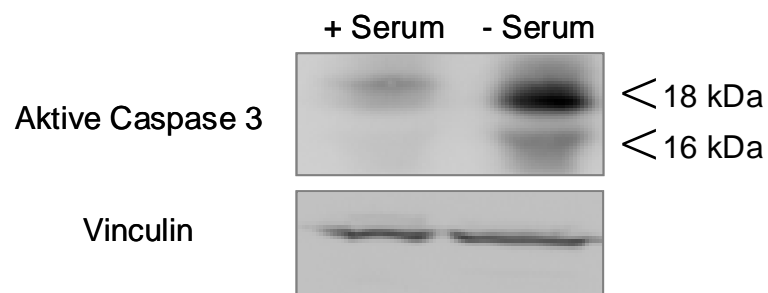


Abb. 5.17: Wirkung von Serumentzug auf die Caspase 3-Spaltung

Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot, welcher die aktiven, 16 und 18 kDa großen, Spaltprodukte der Caspase 3 unbehandelter HUVEC (+ Serum) und HUVEC nach 24 Stunden Serumentzug (- Serum) zeigt. Als Ladungskontrolle diente Vinculin.

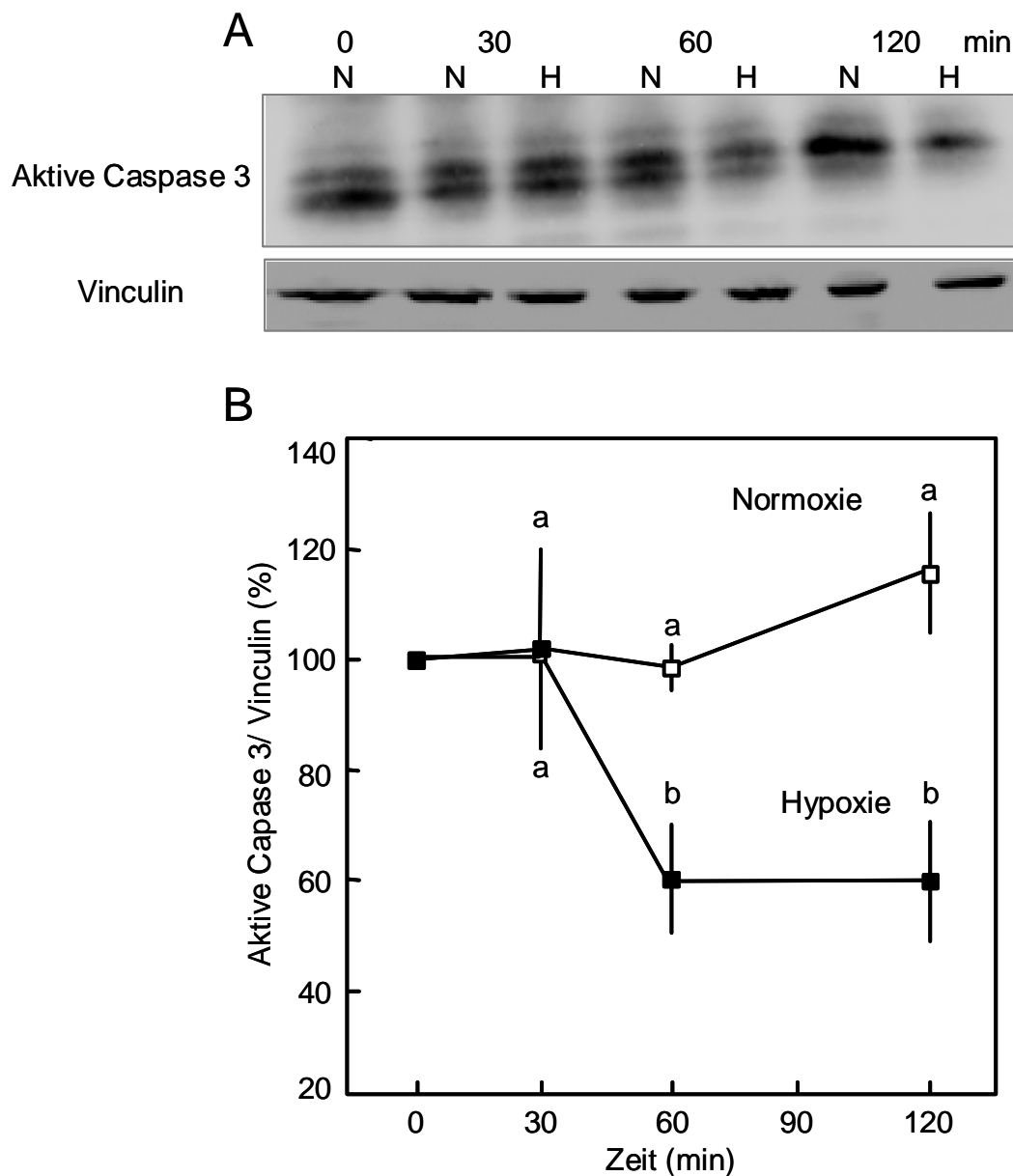


Abb. 5.18: Wirkung von Hypoxie auf die Caspase 3-Spaltung

HUVEC wurde 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen Hypoxie ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die aktiven Spaltprodukte der Caspase 3 nach 0, 30, 60 und 120 Minuten Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) zeigt. Als Ladungskontrolle diente Vinculin.

(B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n=3$ Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P<0,05$).

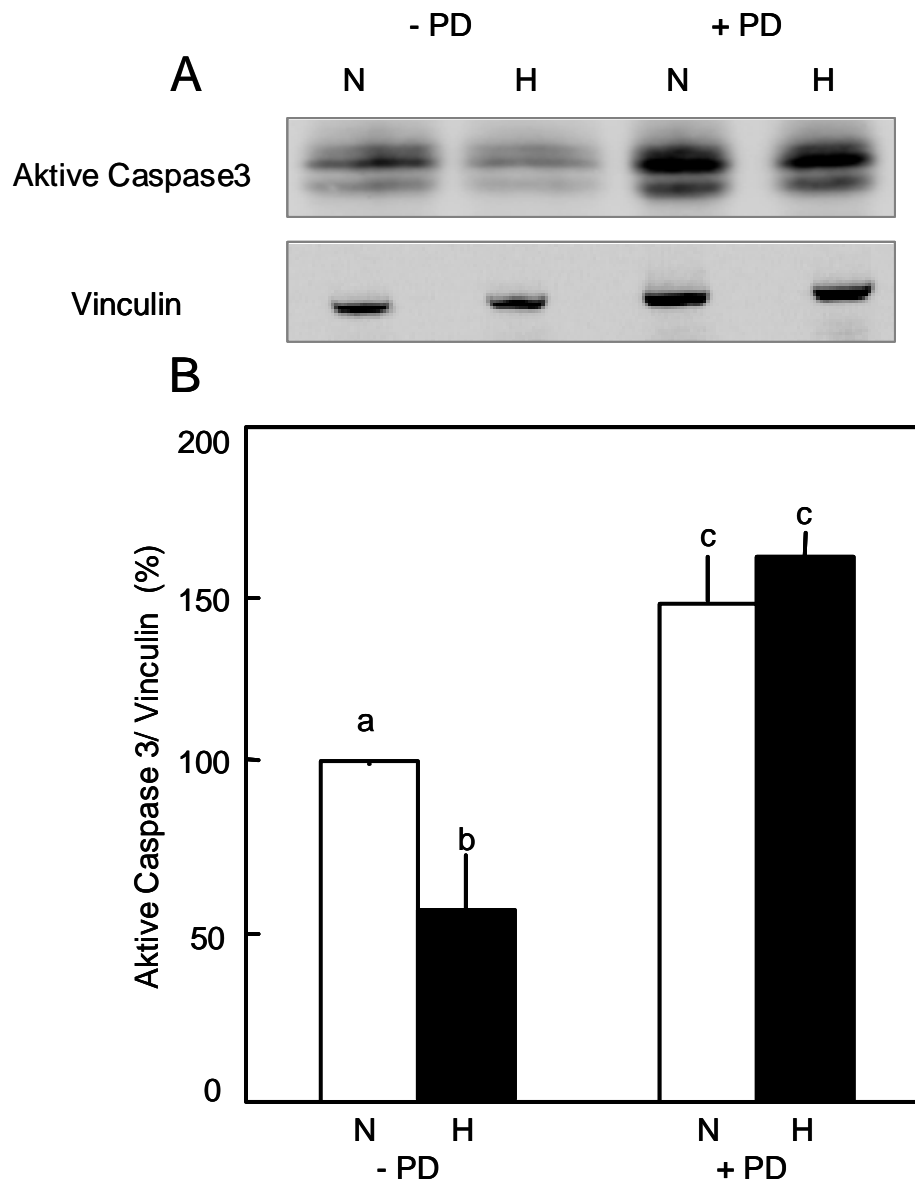


Abb. 5.19: Wirkung des MEK-Inhibitors auf die Hypoxie-vermittelte Reduktion der Caspase 3-Spaltung

HUVEC wurde 24 h das Serum entzogen. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Eine weitere Gruppe wurde einer Hypoxie unter Hemmung der MEK durch PD 98059 (20 μ M) ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die aktiven Spaltprodukte der Caspase 3 nach 120 Minuten Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) ohne (-PD) und mit (+PD) Hemmung von MEK zeigt. Als Ladungskontrolle diente Vinculin.

(B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von n=3 Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P < 0,05$).

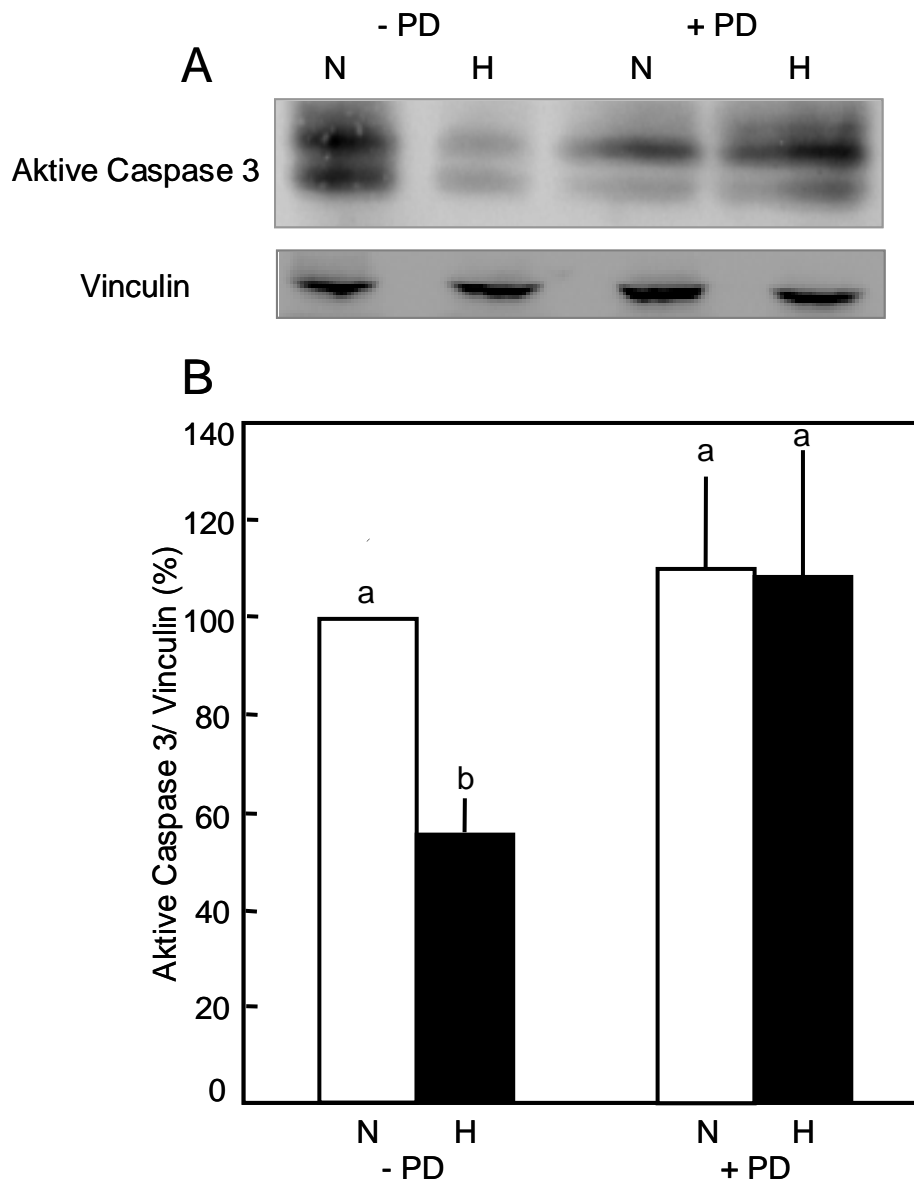


Abb. 5.20: Wirkung des MEK-Inhibitors auf die Hypoxie-vermittelte Reduktion der Caspase 3-Spaltung

HUVEC wurden 24 h mit $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) plus CHX (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine Gruppe von Zellen einer Hypoxie ausgesetzt. Eine weitere Gruppe wurde einer Hypoxie unter Hemmung der MEK durch PD 98059 (20 μM) ausgesetzt. Die Kontrollgruppen wurden für den gleichen Zeitraum unter normoxen Bedingungen inkubiert.

(A) Repräsentativer Western-Blot, welcher die aktiven Spaltprodukte der Caspase 3 nach 120 Minuten Hypoxie (H) bzw. Normoxie (N) ohne (-PD) und mit (+PD) Hemmung von MEK zeigt. Als Ladungskontrolle diente Vinculin.

(B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD von $n=3$ Experimenten von 3 unabhängigen Präparationen. Gruppen, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander ($P<0,05$).

6 Diskussion

Endothelzellen verfügen im Vergleich zu anderen Zellen des Herzens über eine ausgeprägte Hypoxietoleranz, die sie vor einem nekrotischen Zelluntergang schützt. Die zentrale Hypothese dieser Arbeit war, dass Endothelzellen neben diesem metabolischen Schutz über einen endogenen Protektionsmechanismus verfügen, der sie darüber hinaus vor Apoptose schützt. Ziel dieser Studie war es, den molekularen Mechanismus dieses protektiven Effektes zu analysieren.

Die wesentlichen Befunde dieser Arbeit sind, dass transiente Hypoxie Endothelzellen vor dem apoptotischen Zelluntergang schützt. Dabei handelt es sich um einen generellen Mechanismus, der in Endothelzellen verschiedener Gefäßprovinzen und verschiedener Spezies nachgewiesen werden konnte. In HUVEC wurde als zentrales Element des hypoxischen Signalweges der MEK/ERK-Signalweg identifiziert. Es konnte unter intrinsischer Apoptoseinduktion durch Serumentzug gezeigt werden, dass Hypoxie über die Aktivierung von ERK2 zu Phosphorylierung des Bcl-2-Familienmitglieds Bad führt. Vermutlich wird hierdurch der durch Wachstumsfaktorentzug entstandenen Mangel an aktiviertem Akt substituiert. Die Hypoxie-induzierte Phosphorylierung von Bad verhindert die Spaltung der Effektor-Caspase 3 und damit den Eintritt der Endothelzellen in die Endstrecke des apoptotischen Signalweges. Auch unter extrinsischer Apoptoseinduktion durch TNF α /CHX führte Hypoxie zu einer ERK2-abhängigen Bad-Phosphorylierung und reduzierter Caspasespaltung.

6.1 Zellkulturmodell

Es ist bekannt, dass chronische Hypoxie eine anti-apoptotische Wirkung in verschiedenen Zellen erzielen kann. Diese Wirkungsweise wird vorwiegend der klassischen Aktivierung des HIF/VEGF-Signalweges zugeschrieben (Unruh et al. 2003; Chung et al. 2004). Dabei führt Hypoxie zur Aktivierung von HIF, der die Transkription einer Vielzahl an Genen aktiviert, die den Zellen eine metabolische Adaptation an hypoxische Bedingungen ermöglichen. So wird auch die verstärkte Expression von VEGF durch HIF induziert (Liu et al. 1995; Levy et al. 1995), welches

hauptsächlich von Nicht-Endothelzellen gebildet wird und parakrin zur Apoptoseresistenz der Endothelzellen beiträgt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in einem Zellkulturmodell durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden stets in definierten Medien und Wirkstoffkonzentrationen kultiviert. Dadurch konnte der Einfluss von Hypoxie auf apoptotische Endothelkulturen und die zu untersuchenden Signalwege unbeeinflusst von humoralen und mechanischen Einflüssen bestimmt werden. Damit konnten bislang bekannte Mechanismen der Hypoxie-Protektion, die über parakrine Wirkungen nicht endothelialer Zellen vermittelt werden, in diesem Modell ausgeschlossen werden. Vergleichende Versuche mit primären Endothelzellen verschiedener Gefäßprovinzen und Spezies zeigen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit beschriebenen Apoptoseschutz um einen generellen Mechanismus handelt. Durch die Verwendung primärer EC wurde in einem *in vivo* nahen Modell gearbeitet.

6.2 Transiente Hypoxie schützt Endothelzellen vor dem apoptotischen Zelluntergang

Um den anti-apoptotischen Mechanismus zu untersuchen, wurde in Endothelzellen zum einen über Entzug von Wachstumsfaktoren (intrinsische Apoptose) und über Stimulation von Todesrezeptoren (extrinsische Apoptose) definiert ein pro-apoptotisches Signaling ausgelöst (Araki et al.1990, Pohlmann et al. 1989, Li et al. 2002) und anschließend die Auswirkung einer kurzzeitigen Hypoxie untersucht. In HUVEC führte Serumentzug zu einem starken Zellverlust. Dieser Zellverlust konnte durch eine zweistündige Hypoxie-Exposition signifikant reduziert werden. Diese Reduktion des Zellverlustes nach Hypoxie-Exposition wurde auch in mikrovaskulären Koronarendothelzellen der Ratte und makrovaskulären Endothelzellen der Schweineaorta gefunden. Ganz ähnlich führte auch die TNF α /CHX-Exposition von HUVEC zu deutlichem Zellverlust. Auch hier konnte dieser Verlust durch Hypoxie-Exposition signifikant reduziert werden. Diese Befunde zeigen, dass sowohl intrinsische als auch extrinsische Apoptoseinduktion in Endothelzellen verschiedener Gefäßprovinzen und Spezies zu einem starken Zellverlust führen und dass transiente Hypoxie eine protektive Wirkung hat.

Die grundlegende Überlegung war nun, ob die Verringerung des Zellverlusts durch eine Hypoxie-induzierte Proliferation der Zellen, wie sie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte (Schäfer et al. 2003a), oder durch Reduktion des Zelluntergangs verursacht wurde.

Daher wurden in einem ersten Schritt die DNA-Syntheseraten bestimmt. Die Daten zeigen, dass transiente Hypoxie in diesem Modell keinen Einfluss auf die DNA-Syntheserate hat. Die Inkubation mit BrdU in verschiedenen Phasen der Reoxygenierung zeigte keine signifikanten Unterschiede der Inkorporationsraten Hypoxie-exponierter Endothelzellen im Vergleich zu den normoxen Kontrollen. Darüber hinaus zeigte auch die permanente Gegenwart von BrdU während der Reoxygenierungsphase keine signifikanten Differenzen der DNA-Syntheseraten. Ein proliferatives Geschehen konnte folglich ausgeschlossen werden.

In einem zweiten Schritt sollte daher der Zelluntergang näher untersucht und hinsichtlich Apoptose oder Nekrose differenziert werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA zeigte nach 24 Stunden Serumentzug eine deutliche DNA-Fragmentierung. Diese für Apoptose typische „Leiter-Bildung“ zeigt, dass die Endothelzellen während des Serumentzugs in die Apoptose eingetreten sind.

In einem weiteren Schritt wurden die Anteile apoptotischer, nekrotischer und vitaler Zellen mittels FACS-Analyse differenziert. In HUVEC steigerte Serumentzug die Apoptoserate, gleichzeitig nahm der Anteil vitaler Zellen ab. Eine Zellnekrose trat unter diesen Bedingungen kaum auf. Hypoxie-Exposition reduzierte die Apoptoserate und steigerte den Anteil vitaler Zellen signifikant. Der Anteil nekrotischer Zellen wurde hierbei nicht beeinflusst. Ganz ähnliche Befunde konnten in mikrovaskulären Koronarendothelzellen der Ratte sowie makrovaskulären Aortenendothelzellen des Schweins beobachtet werden. TNF α /CHX-Exposition von HUVEC steigerte ebenfalls die Apoptoserate und reduzierte den Anteil vitaler Zellen. Auch hier reduzierte Hypoxie-Exposition die Apoptoserate und steigerte den Anteil vitaler Zellen. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb hierbei unbeeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig, dass kurzzeitige Hypoxie die Resistenz von Endothelzellen gegen verschiedene Apoptosestimuli erhöht. Es ist zwar seit langem bekannt, dass Endothelzellen über eine extreme Toleranz gegenüber Hypoxie verfügen, doch konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Hypoxie Endothelzellen sowohl vor extrinsisch als auch vor intrinsisch induzierter Apoptose schützen kann.

Dabei handelt es sich um ein generelles Phänomen, das in Endothelzellen verschiedener Gefäßprovinzen und Spezies gezeigt werden konnte.

6.3 Hypoxie führt zu einer transienten ERK2-Aktivierung

HUVEC reagieren nach intrinsischer Apoptoseinduktion auf Hypoxie mit einem Anstieg der ERK2-Phosphorylierung nach 10 Minuten. Diese Aktivierung konnte durch einen MEK-Inhibitor vollständig aufgehoben werden. Ganz ähnlich stieg auch nach extrinsischer Apoptoseinduktion in Hypoxie-exponierten Zellen die ERK2-Phosphorylierung nach 10 Minuten an. Auch dieser Anstieg wurde unter MEK-Hemmung vollständig aufgehoben.

Die Inhibition von MEK, ebenso wie die Herabregulation von ERK durch ERK1/2-spezifische Antisense-Oligonukleotide, hob die protektive Wirkung der Hypoxie auf den Zellverlust auf. Darüber hinaus wurden die durch Hypoxie erzielte Reduktion der Apoptoserate und die Zunahme an vitalen Zellen durch ERK 1/2-Antisense-Oligonukleotide vollständig aufgehoben. Auch nach extrinsischer Apoptoseinduktion führte eine ERK-Hemmung zur Aufhebung der protektiven Wirkung transients Hypoxie.

Diese Daten zeigen, dass Hypoxie zu einer transienten Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges führt und dass dieser Weg ein zentrales Element der anti-apoptotischen Wirkung transients Hypoxie darstellt. Dieser Signalweg hemmt sowohl den intrinsisch als auch den extrinsisch induzierten apoptotischen Zelluntergang. In früheren Arbeiten ist gezeigt worden (Schäfer et al. 2003b), dass Hypoxie schon nach wenigen Minuten über die Bildung von mitochondrialen ROS zu einer transienten Aktivierung der ERK 1/2 in Endothelzellen führt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass diese durch Hypoxie induzierte Phosphorylierung von ERK auch in apoptotischen Endothelzellkulturen möglich ist. Weiterhin ist aus früheren Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen bekannt, dass der MEK/ERK-Signalweg an anti-apoptotischen Mechanismen beteiligt ist. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass ERK die Fas-induzierte Apoptose in Jurkat und Hela Zellen (Wilson et al. 1999; Tran et al. 2001), die TNF α induzierte Apoptose in Hela Zellen und Endothelzellen (Tran et al. 2001; Grethe und Porn-Ares 2006), sowie Serumentzug-induzierte Apoptose in HUVEC und glatten Muskelzellen inhibiert

(Shichiri et al. 2000; Trevisi et al. 2004). Auch im Zusammenhang mit der anti-apoptotischen Wirkung von Prä- und Postkonditionierung bei Ischämie/Reperfusionsschäden wird MEK/ERK von einigen Autoren eine zentrale Rolle zugeschrieben (Ping et al. 1999; Rubino und Yellon 2000; Hausenloy et al. 2003; Yang et al. 2004). Diese Arbeiten zeigten in verschiedenen Modellen die anti-apoptotische Wirkung des MEK/ERK-Signalweges. Bislang wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK durch Hypoxie und der Apoptoseresistenz von EC unter hypoxischen Bedingungen hergestellt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang bewiesen werden.

6.4 Hypoxie führt zu einer MEK/ERKvermittelten Bad-Phosphorylierung

Bad bindet im nicht phosphorylierten Zustand Bcl-2 und hemmt so die anti-apoptotische Wirkungsweise von Bcl-2 (Zha et al. 1996). Bad verfügt über drei verschiedene Phosphorylierungsstellen, wobei die Phosphorylierung an einer der drei Stellen zur Aufhebung der Heterodimerbildung mit Bcl-2 und somit seiner pro-apoptotischen Wirkung ausreicht. Untersuchungen haben gezeigt, dass Bad von ERK an der Phosphorylierungsstelle Serin 112 phosphoryliert wird (Fang et al. 1999). Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle Serin 112 analysiert.

Hypoxie löste in HUVEC nach intrinsischer Apoptoseinduktion eine Bad-Phosphorylierung an Serin 112 aus. Die Hemmung von MEK hob die Hypoxie-induzierte Bad-Phosphorylierung vollständig auf. Ganz ähnliches Verhalten zeigte die Bad-Phosphorylierung nach der extrinsischen Apoptoseinduktion.

Diese Daten zeigen, dass Hypoxie sowohl nach Induktion der intrinsischen als auch der extrinsischen Apoptose zu einer ERK-abhängigen Bad-Phosphorylierung führt.

Neben ERK kann auch Akt Bad phosphorylieren und damit deren apoptotische Wirkung aufheben (Datta et al. 1997; del Pes et al. 1997; Lizcano et al. 2000). Akt ist ein wichtiges anti-apoptotisches Signal, das u.a. über PI3-Kinase durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird. Durch Mangel an Wachstumsfaktoren wird Akt demzufolge inaktiviert. In Übereinstimmung damit konnte in der hier vorliegenden Arbeit unter Serumentzug in HUVEC eine nahezu vollständige Dephosphorylierung

von Akt beobachtet werden. Damit war die anti-apoptotische Wirkung von Akt aufgehoben. Zweistündige Hypoxie-Exposition führte zu keiner Aktivierung von Akt. Im Gegensatz zum Serumentzug führte die Exposition der Zellen mit TNF α /CHX zu keiner Veränderung des basalen Phosphorylierungsstatus von Akt. Auch hier führte eine zweistündige Hypoxie-Exposition zu keiner weiteren Aktivierung von Akt.

Diese Ergebnisse zeigen zunächst das unterschiedliche Verhalten von Akt bei intrinsisch und extrinsisch induzierter Apoptose. Während Akt im Signalweg der intrinsischen Apoptoseinduktion durch Serumentzug eine zentrale Rolle spielt, da es durch die Inaktivierung von Akt durch den vorliegenden Wachstumsfaktormangel zu Dephosphorylierung von Bad kommt, was letztendlich zu Apoptose führt (s. Kap. 2.4), ist es in den Signalweg der extrinsisch induzierten Apoptose nicht involviert. Unabhängig von den Ausgangsbedingungen wird die Phosphorylierung von Akt durch Hypoxie nicht beeinflusst. Akt ist demzufolge an der protektiven Wirkung transienter Hypoxie nicht beteiligt.

Zusammen genommen zeigen diese Befunde, dass Hypoxie sowohl nach intrinsisch als auch nach extrinsisch induzierter Apoptose zu einer über ERK-vermittelten Phosphorylierung von Bad führt. Dahingegen nimmt Hypoxie keinen Einfluss auf die Akt- Phosphorylierung. Bei intrinsisch induzierter Apoptose durch Serumentzug kann Hypoxie demzufolge durch ERK-abhängige Bad-Phosphorylierung den durch Wachstumsfaktorentzug entstandenen Mangel an aktivem Akt substituieren. Interessanterweise greift dieser Mechanismus auch bei extrinsisch induzierter Apoptose. Obwohl hier Akt stets auf einem Basalniveau phosphoryliert ist, führt Hypoxie über ERK zu einer verstärkten Bad-Phosphorylierung.

Auch in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden (Scheid et al. 1999; Solhaug et al. 2005; Grethe und Porn-Ares 2006), dass MEK/ERK seine anti-apoptotische Wirkung über die Phosphorylierung von Bad vermittelt. In diesen Arbeiten wurde der MEK/ERK-Signalweg durch Wachstumsfaktoren oder Phorbolester stimuliert. In der hier vorliegenden Studie konnte nun gezeigt werden, dass dieser Signalweg durch transiente Hypoxie aktiviert werden kann.

Die Beobachtung in der vorliegenden Arbeit, dass eine transiente Hypoxie von zwei Stunden keinen Einfluss auf die Aktivität von Akt hat, sind in Übereinstimmung mit Befunden aus der Literatur (Beitner-Johnson et al. 2001), die zeigen dass unter ganz

ähnlichen Kulturbedingungen erst nach 6 Stunden anhaltender Hypoxie eine Aktivierung von Akt auftritt.

6.5 Hypoxie führt über den MEK/MAPK-Bad-Signalweg zu einer verminderten Caspase 3-Spaltung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Caspaseaktivierung zum einen gelelektrophoretisch und zum anderen immuncytochemisch analysiert. Mittels Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass intrinsische Apoptoseinduktion durch Serumentzug zu starker Aktivierung von Caspase 3 führte und die Gesamtmenge an aktiven Spaltprodukten während der Hypoxie-Exposition signifikant abnahm. Diese Reduktion der Caspasespaltung konnte durch MEK-Hemmung vollständig aufgehoben werden. Die Einzelzellanalyse durch Immuncytochemie zeigt, dass in Hypoxie-exponierten Kulturen deutlich weniger Caspase-positive Zellen detektiert wurden als in den normoxen Kontrollen. Nach extrinsisch induzierter Apoptose wurde gelelektrophoretisch ebenfalls eine Reduktion der Caspasespaltung während Hypoxie gefunden, welche durch MEK-Hemmung vollständig aufgehoben wurde.

Die Ergebnisse der Immuncytochemie zeigen, dass nach Hypoxie-Exposition deutlich weniger Zellen in die Apoptose eintraten. Der signifikanten Reduktion der Caspasespaltung im Western-Blot lag demzufolge eine erhöhte Resistenz der einzelnen Zellen gegenüber den apoptotischen Stimuli zugrunde. Da am Ende des apoptotischen Signalweges die Auflösung der Zellen in apoptotische Körperchen steht, sind diese zugrunde gegangenen Zellen sowohl in der Immuncytochemie als auch im Western-Blot nicht mehr nachweisbar. Demzufolge wurden in beiden Verfahren die Zellen nachgewiesen, die in diesem Moment in die Endstrecke des Apoptosesignalweges eintraten und den „point of no return“ überschritten, womit der Zeitpunkt definiert wird, zu dem in die Apoptose getriebene Zellen nicht mehr gerettet werden können (Chang et al. 2002).

In Übereinstimmung mit den gezeigten immuncytochemischen Befunden haben Einzelzellanalysen anderer Autoren gezeigt, dass Caspase 3-Aktivierung über das „Alles-oder-nichts-Prinzip“ abläuft (Rehm et al. 2002). Weiterhin zeigt Chang et al., dass der „point of no return“ mit der Caspase-Aktivierung einsetzt (Chang et al.

2002), welche über einen äußerst raschen Prozess innerhalb von Minuten zum Tod der Zelle führt (Tyas et al. 2000).

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Szenario: Hypoxie löst schnell aktivierbare, ERK-abhängige Prozesse aus, welche die Spaltung von Caspase verhindern. Die ERK-abhängige Phosphorylierung von Bad führt dabei sowohl nach intrinsischer als auch nach extrinsischer Apoptoseinduktion zu einer Verschiebung des sensiblen Gleichgewichtes der pro -und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder auf die anti-apoptotische Seite. Damit wird der Eintritt der Zellen in die Endstrecke der Apoptose unterbunden und so die Resistenz gegen apoptotische Stimuli erhöht.

6.6 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Endothelzellen neben dem aus ihrer metabolischen Stabilität resultierenden Nekroseschutz über einen spezifischen, endogenen und durch kurzzeitige Hypoxie induzierbaren Apoptoseschutz verfügen. Es konnte gezeigt werden, dass kurzzeitige Hypoxie sehr frühe und schnell wirksame endogene anti-apoptotische Signale induziert, welche die Apoptoseresistenz von Endothelzellen sowohl nach intrinsischer als auch nach extrinsischer Apoptoseinduktion signifikant erhöhen. Es wurde erstmalig der Zusammenhang zwischen der Aktivierung von ERK durch Hypoxie und der Apoptoseresistenz von Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen hergestellt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aktivierung von ERK durch Hypoxie den durch Wachstumsfaktorentzug induzierten Mangel an Akt substituiert, dessen anti-apoptotische Funktion durch Phosphorylierung von Bad übernimmt und so Endothelzellen vor dem Eintritt in die Endstrecke der Apoptose schützt. Auch nach extrinsisch induzierter Apoptose konnte unter Hypoxie eine vermehrte ERK-abhängige Bad-Phosphorylierung und eine verminderte Caspasespaltung gezeigt werden.

Diese Ergebnisse sind von besonderem Interesse, da dieser schnell induzierbare Effekt offensichtlich an der extremen Hypoxietoleranz von Endothelzellen beteiligt ist (Aaronson et al. 1995). Dieser Mechanismus ist als Selbstschutz endothelialer Zellen im hypoxischen Geschehen aufzufassen. *In vivo* führt chronische Hypoxie durch Aktivierung von HIF zu verstärkter Expression von VEGF (Levy et al. 1995; Liu et al.

1995), welches, parakrin gebildet, über ein starkes anti-apoptotisches Potential verfügt (Unruh et al. 2003; Risbud et al. 2005). Die Expression von VEGF erfordert jedoch Zeit und ist frühestens nach 12 Stunden Hypoxie zu finden (Namiki et al. 1995). Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte endogene, schon nach Minuten wirksame Mechanismus stellt möglicherweise einen Überbrückungsmechanismus dar, bis potentere anti-apoptotische Stimuli wie VEGF exprimiert werden.

Die Selbstschutzmechanismen von Endothelzellen zu verstehen ist von großer therapeutischer Relevanz. So könnte durch gezielte Unterstützung dieser bereits endogen aktivierten Mechanismen maßgeblich zum Therapieerfolg von Ischämie/Reperfusionsschäden beigetragen werden.

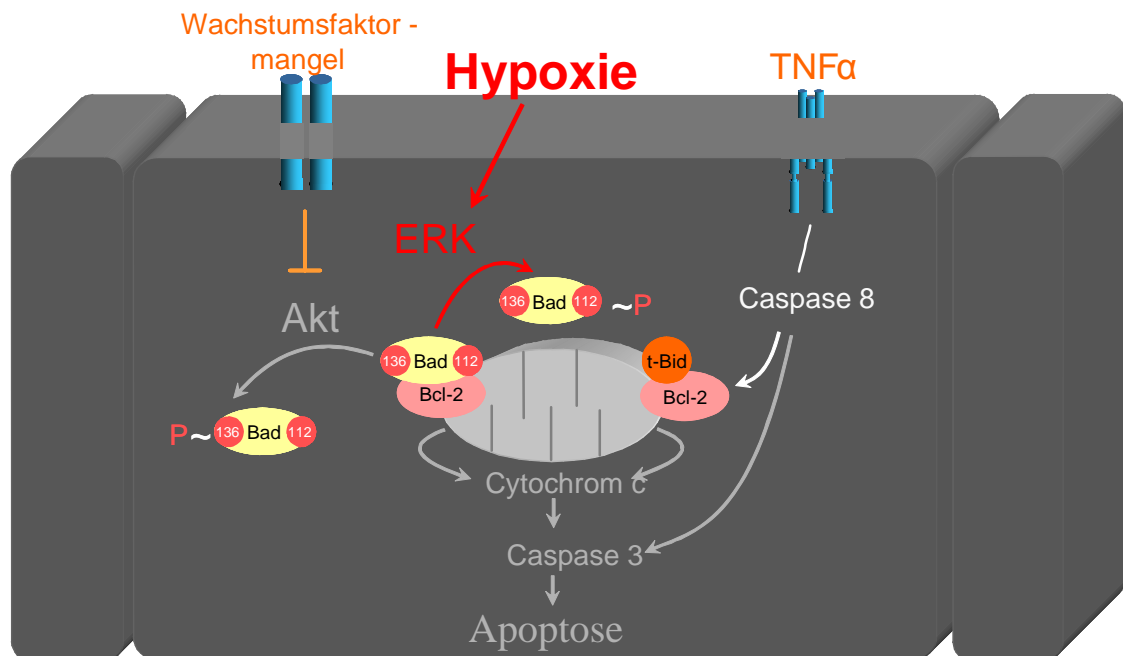


Abb. 6.1: Schema der anti-apoptotischen Wirkung transientscher Hypoxie auf Endothelzellen.

7. Zusammenfassung

Endothelzellen verfügen über eine extreme Stresstoleranz gegenüber Hypoxie. Dies wurde in der Vergangenheit vor allem ihrer Fähigkeit zugeschrieben, unter hypoxischen Bedingungen ihr Phosphorylierungspotential aufrechterhalten zu können. Diese Fähigkeit mag eine ausreichende Erklärung für den Schutz vor nekrotischem Zelltod sein, nicht jedoch vor dem gleichermaßen bestehenden Schutz vor dem apoptotischen Zelltod. Bislang ist wenig über anti-apoptotische Mechanismen nach kurzzeitiger Hypoxie bekannt. In dieser Studie wurde der Effekt von Hypoxie auf den apoptotischen Zelltod untersucht, der zuvor zum einen durch Serumentzug und zum anderen durch TNF α /CHX induziert worden war.

Um den endogenen anti-apoptotischen Effekt in Endothelzellen zu untersuchen, wurde Apoptose zum einen durch Serumentzug für 24 Stunden und zum anderen durch Inkubation mit TNF α /CHX für 24 Stunden ausgelöst. Anschließend wurden die Zellen einer zweistündigen Hypoxie ausgesetzt, gefolgt von 24 Stunden Reoxygenierung. Zwei Stunden Hypoxie schützten die Endothelzellen in beiden Modellen vor dem apoptotischen Zelltod. Nach 24 Stunden Reoxygenierung konnte eine signifikant verminderte Anzahl apoptotischer Zellen bei gleichzeitig signifikant gesteigerter Anzahl vitaler Zellen gezeigt werden. Dieser Effekt konnte durch die Inhibierung der MEK 1/2 durch PD 98059 oder der Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden gegen ERK1/2 aufgehoben werden. Hypoxie führte zu einer transienten Aktivierung von ERK und Inaktivierung des pro-apoptotischen Bad durch Phosphorylierung an Serin 112, einer spezifische Phosphorylierungsstelle für ERK, sowie zu einer Reduktion der Aktivierung der Caspase 3. Die Hemmung von ERK unterdrückte neben der Hypoxie-induzierten ERK-Aktiverung auch die Bad-Phosphorylierung sowie die Reduktion der Caspasespaltung. Diese Daten zeigen, dass Endothelzellen neben dem aus ihrer metabolischen Stabilität resultierenden Nekroseschutz über einen spezifischen, endogenen und durch kurzzeitige Hypoxie induzierbaren Apoptoseschutz verfügen. Es konnte gezeigt werden, dass kurzzeitige Hypoxie sehr frühe und schnell wirksame endogene anti-apoptotische Signale induziert, welche die Apoptoseresistenz von Endothelzellen sowohl nach intrinsischer als auch nach extrinsischer Apoptoseinduktion signifikant erhöhen. Dieser Signalweg beruht auf der endogenen transienten Aktivierung des MEK/ERK-Signalweges, welche zu Phosphorylierung von Bad und reduzierter Aktivierung der Caspase 3 führt.

Summary

Endothelial Cells are extremely resistant against hypoxia. In the past this was traced back to the fact, that endothelial cells are able to sustain their phosphorylation potential during hypoxic conditions. This ability may be a sufficient explanation for the protection against necrotic cell death but not against apoptotic cell death. Little is known about anti-apoptotic mechanisms in response to short time hypoxia. In this study the effects of hypoxia on apoptotic cell death induced by serum starvation on the one hand and incubation with TNF α /CHX on the other hand was analysed.

To analyse the anti-apoptotic mechanisms in endothelial cells. Apoptosis was induced by either serum starvation for 24 hours or incubation with TNF α /CHX for 24 hours. Subsequently cells were subjected to 2 hours of hypoxia followed by 24 hours of reoxygenation. Two hours of hypoxia protected endothelial cells from apoptotic execution, as evidenced by decreased apoptosis and increase of the number of healthy cells 24 hours after reoxygenation. This protective effect was inhibited by MEK 1/2 inhibitor PD 98059 as well as by antisense oligonucleotides against ERK1/2. Hypoxia induced a transient activation of ERK2 and phosphorylation of the pro-apoptotic Bad at serine 112, a specific phosphorylation site of ERK leading to its inactivation and a reduction of activation of caspase 3. Inhibition of ERK activation abolished beside the hypoxia-induced ERK activation the Bad phosphorylation and reduction of Caspase cleavage. The data demonstrated that hypoxia protects endothelial cells by a specific endogenous pathway from apoptosis. It was demonstrated that short time hypoxia leads to early endogenous anti-apoptotic signals, which increase apoptotic resistance against intrinsic and extrinsic apoptosis. This signaling pathway leads by activation of the MEK/ERK pathway to phosphorylation of bad and reduction of caspase 3 cleavage.

8. Literaturverzeichnis

1. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendation guidelines physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc. Res.* 35: 2-3, 1997.
2. **Aaronson RM, Graven KK, Tucci M, McDonald RJ und Farber HW.** Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J Biol Chem* 270: 27752-27757, 1995.
3. **Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X und Akey CW.** Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9: 423-432, 2002.
4. **Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW und Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171, 1996.
5. **Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermoud JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R und Martinou JC.** Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277: 370-372, 1997.
6. **Araki S, Shimada Y, Kaji K und Hayashi H.** Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 1194-1200, 1990.
7. **Beitner-Johnson D, Rust RT, Hsieh TC und Millhorn DE.** Hypoxia activates Akt and induces phosphorylation of GSK-3 in PC12 cells. *Cell Signal* 13: 23-27, 2001.
8. **Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V und Di Lisa F.** Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 264: 687-701, 1999.

9. **Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PR, Marco SD, Krebs JF, Wu JC, Tomaselli KJ und Grutter MG.** The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure* 7: 1125-1133, 1999.
10. **Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G und Thompson CB.** Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608, 1993.
11. **Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH und Wallach D.** Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270: 387-391, 1995.
12. **Buderus S, Siegmund B, Spahr R, Krutzfeldt A und Piper HM.** Resistance of endothelial cells to anoxia-reoxygenation in isolated guinea pig hearts. *Am J Physiol* 257: H488-H493, 1989.
13. **Bursch W, Oberhammer F und Schulte-Hermann R.** Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* 13: 245-251, 1992.
14. **Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S und Reed JC.** Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321, 1998.
15. **Chang HY und Yang X.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 821-846, 2000.
16. **Chang L und Karin M.** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001.
17. **Chang LK, Putcha GV, Deshmukh M und Johnson EM, Jr.** Mitochondrial involvement in the point of no return in neuronal apoptosis. *Biochimie* 84: 223-231, 2002.
18. **Chen-Levy Z, Nourse J und Cleary ML.** The Bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in

- lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol* 9: 701-710, 1989.
19. **Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI und Guild BC.** Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374: 733-736, 1995.
20. **Chung J, Yoon S, Datta K, Bachelder RE und Mercurio AM.** Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor transcription and protection from apoptosis are dependent on $\alpha 6\beta 1$ integrin in breast carcinoma cells. *Cancer Res* 64: 4711-4716, 2004.
21. **Cobb MH und Goldsmith EJ.** How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270: 14843-14846, 1995.
22. **Coffer PJ, Jin J und Woodgett JR.** Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 335 (Pt 1): 1-13, 1998.
23. **Cuisnier O, Serduc R, Lavieille JP, Longuet M, Reyt E und Riva C.** Chronic hypoxia protects against gamma-irradiation-induced apoptosis by inducing Bcl-2 up-regulation and inhibiting mitochondrial translocation and conformational change of bax protein. *Int J Oncol* 23: 1033-1041, 2003.
24. **Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y und Greenberg ME.** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241, 1997.
25. **del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R und Nunez G.** Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278: 687-689, 1997.
26. **Ellis RE, Yuan JY und Horvitz HR.** Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7: 663-698, 1991.
27. **Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A und Nagata S.** A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998.

28. **English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S und Cobb MH.** New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253: 255-270, 1999.
29. **Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ, Koritzinsky M, Wouters BG, Wilson C, Miller C, Demonacos C, Stratford IJ und Dive C.** Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 24: 2875-2889, 2004.
30. **Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM und Bratton DL.** Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 1071-1077, 2001.
31. **Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC, Jr., Boyd D und Mills GB.** Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene* 18: 6635-6640, 1999.
32. **Fisslthaler B, Benzing T, Busse R und Fleming I.** Insulin enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide* 8: 253-261, 2003.
33. **Folkman J und Klagsbrun M.** Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature* 329: 671-672, 1987.
34. **Furchgott RF und Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
35. **Gibson L, Holmgreen SP, Huang DC, Bernard O, Copeland NG, Jenkins NA, Sutherland GR, Baker E, Adams JM und Cory S.** Bcl-w, a novel member of the Bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* 13: 665-675, 1996.
36. **Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, Korsmeyer SJ und Shore GC.** Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143: 207-215, 1998.

37. **Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV und Farber HW.** Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J Biol Chem* 269: 24446-24453, 1994.
38. **Graven KK, Zimmerman LH, Dickson EW, Weinhouse GL und Farber HW.** Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. *J Cell Physiol* 157: 544-554, 1993.
39. **Grethe S und Porn-Ares MI.** p38 MAPK regulates phosphorylation of Bad via PP2A-dependent suppression of the MEK1/2-ERK1/2 survival pathway in TNF-alpha induced endothelial apoptosis. *Cell Signal* 18: 531-540, 2006.
40. **Gross A, McDonnell JM und Korsmeyer SJ.** Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899-1911, 1999.
41. **Hamasu T, Inanami O, Tsujitani M, Yokoyama K, Takahashi E, Kashiwakura I und Kuwabara M.** Post-irradiation hypoxic incubation of X-irradiated MOLT-4 cells reduces apoptotic cell death by changing the intracellular redox state and modulating SAPK/JNK pathways. *Apoptosis* 10: 557-567, 2005.
42. **Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B und Blostein MD.** Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1207-H1213, 2004.
43. **Hausenloy DJ, Duchon MR und Yellon DM.** Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 60: 617-625, 2003.
44. **Hausenloy DJ und Yellon DM.** Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res* 70: 240-253, 2006.
45. **Hengartner MO, Ellis RE und Horvitz HR.** Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356: 494-499, 1992.
46. **Hsu H, Xiong J und Goeddel DV.** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81: 495-504, 1995.

47. **Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M und Hsueh AJ.** Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12401-12406, 1997.
48. **Jaattela M.** Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* 248: 30-43, 1999.
49. **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG und Minick CR.** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756, 1973.
50. **Kerr JF.** Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105: 13-20, 1971.
51. **Kerr JF und Searle J.** A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 107: 41-44, 1972.
52. **Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD und Barr PJ.** Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374: 736-739, 1995.
53. **Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR und Newmeyer DD.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132-1136, 1997.
54. **Kohn J und Riches PG.** A cellulose acetate immunofixation technique. *J Immunol Methods* 20: 325-331, 1978.
55. **Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE und Oltvai ZN.** Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-332, 1993.
56. **Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P und Craig RW.** MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3516-3520, 1993.

57. **Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W und Reed JC.** Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701-4714, 1993.
58. **Kroemer G, Zamzami N und Susin SA.** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18: 44-51, 1997.
59. **Kyhse-Andersen J.** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10: 203-209, 1984.
60. **Kyriakis JM und Avruch J.** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81: 807-869, 2001.
61. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
62. **Levy AP, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo KT, Koren G, Colucci WS und Goldberg MA.** Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 76: 758-766, 1995.
63. **Li H, Zhu H, Xu CJ und Yuan J.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501, 1998.
64. **Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebti SM, Hamilton AD und Harlan JM.** Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 15309-15316, 2002.
65. **Liebmman C.** Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal* 13: 777-785, 2001.
66. **Liu Y, Cox SR, Morita T und Kourembanas S.** Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77: 638-643, 1995.

67. **Lizcano JM, Morrice N und Cohen P.** Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J* 349: 547-557, 2000.
68. **Lorenz HM, Herrmann M, Winkler T, Gaip U und Kalden JR.** Role of apoptosis in autoimmunity. *Apoptosis* 5: 443-449, 2000.
69. **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C und Wang X.** Bid, a -2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490, 1998.
70. **Meininger CJ und Granger HJ.** Mechanisms leading to adenosine-stimulated proliferation of microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 258: H198-H206, 1990.
71. **Meininger CJ, Schelling ME und Granger HJ.** Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am J Physiol* 255: H554-H562, 1988.
72. **Mertens S, Noll T, Spahr R, Krutzfeldt A und Piper HM.** Energetic response of coronary endothelial cells to hypoxia. *Am J Physiol* 258: H689-H694, 1991.
73. **Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M und Thompson CB.** Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 385: 353-357, 1997.
74. **Moncada S.** Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 811: 60-67, 1997.
75. **Naismith JH und Sprang SR.** Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 23: 74-79, 1998.
76. **Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L und Isner JM.** Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 31189-31195, 1995.
77. **Nguyen M, Millar DG, Yong VW, Korsmeyer SJ und Shore GC.** Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem* 268: 25265-25268, 1993.

78. **Noll T, Wissemann P, Mertens S, Kruztfeldt A, Spahr R, Piper HM** Hypoxia tolerance of coronary endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 277: 467-76, 1990.
79. **Oltvai ZN, Milliman CL und Korsmeyer SJ.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993.
80. **Phillips PG, Birnsby LM, Narendran A.** Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *Am J Physiol* 268:L789-L800, 1995
81. **Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, Qiu Y, Manchikalapudi S, Auchampach JA, Black RG und Bolli R.** PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol* 276: H1468-H1481, 1999.
82. **Plendl J, Sinowatz F und Auerbach R.** The heterogeneity of the vascular endothelium. *Anat Histol Embryol* 21: 256-262, 1992.
83. **Pohlman TH und Harlan JM.** Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol* 119: 41-52, 1989.
84. **Ravagnan L, Roumier T und Kroemer G.** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192: 131-137, 2002.
85. **Raveendran M, Wang J, Senthil D, Wang J, Utama B, Shen Y, Dudley D, Zhang Y und Wang XL.** Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking induced apoptosis in endothelial cells. *FEBS Lett* 579: 733-740, 2005.
86. **Reed JC.** Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415-1430, 2000.
87. **Rehm M, Dussmann H, Janicke RU, Tavaré JM, Kogel D und Prehn JH.** Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3. *J Biol Chem* 277: 24506-24514, 2002.

88. **Richards JM, Gibson IF und Martin W.** Effects of hypoxia and metabolic inhibitors on production of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor by pig aortic endothelial cells. *Br. J Pharmacol.* 102: 203-209, 1991.
89. **Risbud MV, Fertala J, Vresilovic EJ, Albert TJ und Shapiro IM.** Nucleus pulposus cells upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways under hypoxic conditions and resist apoptosis induced by serum withdrawal. *Spine* 30: 882-889, 2005.
90. **Robinson MJ und Cobb MH.** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186, 1997.
91. **Rubino A und Yellon DM.** Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart? *Trends Pharmacol Sci* 21: 225-230, 2000.
92. **Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW und Hunninghake GW.** Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C273-C281, 2002.
93. **Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH und Peter ME.** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17: 1675-1687, 1998.
94. **Schäfer M, Ewald N, Schäfer C, Stapler A, Piper HM und Noll T.** Signaling of hypoxia-induced autonomous proliferation of endothelial cells. *FASEB J* 17: 449-451, 2003a.
95. **Schäfer M, Schäfer C, Ewald N, Piper HM und Noll T.** Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. *Circ Res* 92: 1010-1015, 2003b.
96. **Scheid MP, Schubert KM und Duronio V.** Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase. *J Biol Chem* 274: 31108-31113, 1999.

97. **Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M und Reed JC.** Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5113-5118, 1997.
98. **Schramek H.** MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* 17: 62-67, 2002.
99. **Schwartz P, Piper HM, Spahr R, und Spieckermann PG.** Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Pathol.* 115: 349-361, 1984.
100. **Sheridan AM, Schwartz JH, Kroshian VM, Tercyak AM, Laraia j, Masino S und Lieberthal W.** Renal mouse proximal tubular cells are more susceptible than MDCK cells to chemical anoxia. *Am. J. Physiol* 265: F342-F350, 1993.
101. **Shichiri M, Yokokura M, Marumo F und Hirata Y.** Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 989-997, 2000.
102. **Short SM, Boyer JL und Juliano RL.** Integrins regulate the linkage between upstream and downstream events in G protein-coupled receptor signaling to mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 12970-12977, 2000.
103. **Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR und Martin SJ.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144: 281-292, 1999.
104. **Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, Kay M, Winn R und Harlan J.** Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. *J Biol Chem* 274: 8039-8045, 1999.
105. **Sumpio BE, Riley JT und Dardik A.** Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1508-1512, 2002.

106. **Tanaka S, Saito K und Reed JC.** Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 268: 10920-10926, 1993.
107. **Tong H, Chen W, Steenbergen C und Murphy E.** Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res* 87: 309-315, 2000.
108. **Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM und Eriksson JE.** MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 276: 16484-16490, 2001.
109. **Tretyakov AV und Farber HW.** Endothelial cell tolerance to hypoxia. Potential role of purine nucleotide phosphates. *J Clin Invest* 95: 738-744, 1995.
110. **Trevisi L, Visentin B, Cusinato F, Pighin I und Luciani S.** Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 716-721, 2004.
111. **Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC und Croce CM.** Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097-1099, 1984.
112. **Tyas L, Brophy VA, Pope A, Rivett AJ und Tavaré JM.** Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep* 1: 266-270, 2000.
113. **Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N und Das DK.** Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation* 109: 3042-3049, 2004.
114. **Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM und Wenger RH.** The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene* 22: 3213-3220, 2003.

115. **van Hinsbergh WM.** Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1018-1023, 1997.
116. **Vaux DL, Cory S und Adams JM.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442, 1988.
117. **Vaux DL und Korsmeyer SJ.** Cell death in development. *Cell* 96: 245-254, 1999.
118. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H und Reutelingsperger C.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51, 1995.
119. **Walczak H und Krammer PH.** The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256: 58-66, 2000.
120. **Walker C, Robertson L, Myskow M und Dixon G.** Expression of the Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 72: 164-169, 1995.
121. **Wang GL und Semenza GL.** General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4304-4308, 1993.
122. **Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL und Korsmeyer SJ.** BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10: 2859-2869, 1996.
123. **Wilson DJ, Alessandrini A und Budd RC.** MEK1 activation rescues Jurkat T cells from Fas-induced apoptosis. *Cell Immunol* 194: 67-77, 1999.
124. **Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA und Raybuck SA.** Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370: 270-275, 1994.
125. **Wyllie A.** Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* 391: 20-21, 1998.

126. **Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980.
127. **Yang E und Korsmeyer SJ.** Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88: 386-401, 1996.
128. **Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB und Korsmeyer SJ.** Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291, 1995.
129. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP und Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275: 1129-1132, 1997.
130. **Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM und Cohen MV.** Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 44: 1103-1110, 2004.
131. **Yokoi K und Fidler IJ.** Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine. *Clin Cancer Res* 10: 2299-2306, 2004.
132. **Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM und Horvitz HR.** The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75: 641-652, 1993.
133. **Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J und Korsmeyer SJ.** Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-x(l). *Cell* 87: 619-628, 1996.
134. **Zimmerman LH, Levine RA und Farber HW.** Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 87: 908-914, 1991.
135. **Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A und Wang X.** Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413, 1997.

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Noll für die Betreuung dieser Arbeit. Ich werde mich sicherlich immer gerne an die vielen intensiven und gelegentlich hitzigen Diskussionen erinnern. Darüber hinaus möchte ich ihm herzlich für die Bereitstellung eines Stipendiums innerhalb des Graduiertenkollegs 534 und die aufopferungsvolle Leitung desselben danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper, Leiter des physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Fachbereich Humanmedizin, danke ich für die Bereitstellung des sehr gut eingerichteten Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. J. Roth danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität.

Für das jederzeit offene Ohr sowohl im fachlichen als auch im privaten Bereich möchte ich Frau Dr. Frauke Härtel danken.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank den medizinisch-technischen Assistenten Anika Seipp, Anna Reis und Hermann Holzträger für die fachliche Unterstützung, die geduldigen Erklärungen und den vielen Spaß bei der Arbeit.

Allen weiteren Mitarbeitern, vor allem aber meinen Mitdoktoranden und Mitstipendiaten, von denen ich heute einige meine Freunde nennen darf, danke ich für die vielen lustigen Stunden und den gemeinsamen Weg durch Höhen und Tiefen.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die immerwährende Unterstützung. Ganz besonderer Dank gilt hier meinem Verlobten Oliver Hönig, zum einen für die Korrekturlesung dieser Arbeit, viel mehr aber noch für die Begleitung durch manches Tief und die viele Kraft, die mir sein Glaube an mich gegeben hat.

Erklärung

Ich erkläre: ich habe die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Marion Holl

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5283-8

